

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 1/2020

Obiectiv 1: Caracterizarea compozitiei chimice si a proprietatilor enzimactice si biofizice ale uleiului de armurariu presat la rece, obtinerea biocatalizatorului adaptat la temperaturi scazute pentru transesterificarea silibinei

1.1. Analiza compozitiei de acizi grasi a uleiului de armurariu

Armurariul (ciulinul de lapte) (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), numit și *anghinare sălbatică*, este o plantă medicinală folosită de mii de ani ca remediu hepatoprotector pentru o varietate de boli. S-a demonstrat că *Silybum marianum* are aplicații clinice în tratamentul hepatitei toxice, ficatului gras, cirozei, leziunilor ischemice și hepatitei virale ([Rainone, F., Am. Fam. Physician, 2005, 72, 1285–1288](#)). Armurariul este originar din zona Mării Mediterane din Asia Centrală, crește în sălbăcie și în Europa, în unele părți ale Americii și Australiei. De asemenea, poate fi cultivat și în mod controlat. În România, zonele de cultură a plantei de armurariu sunt situate în Câmpia Bărăganului, Câmpia Burnazului, Câmpia Olteniei și Câmpia Timișului ([Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies, 2017, ISSN Online 2285-1372](#)). Armurariu este cunoscut pentru componenta principală a extractului din fructe (silimarina), un flavonolignan numit silibină. Din semințele de armurariu poate fi extras cu un ulei bogat în acid linoleic cu randament de peste 50%. Acest conținut relativ ridicat de ulei și acid linoleic a făcut posibilă clasificarea plantei de armurariu ca plantă oleaginoasă. ([Mhamdi B., Abbassi F., Smaoui A., Abdelly C., Marzouk B., Pak. J. Pharm. Sci., 29, 3, 951-959, 2016.](#))

Compoziția și proprietățile uleiului de armurariu au fost determinate și evaluate în comparație cu alte patru uleiuri răspândite. Toate uleiurile utilizate în acest studiu au fost procurate din comerț fiind produse autohtone, cu excepția uleiului de masline. Uleiurile au fost utilizate fără o purificare prealabilă și păstrate la întuneric.

Analiza compoziției uleiului de armurariu și uleiurilor de comparație a fost realizată prin metoda cromatografică și spectrofotometrică.

Compoziția a acizilor grași esențiali în uleiurile menționate (Ulei de Armurariu (AR), Ulei de Floarea Soarelui (FS), Ulei de Masline (MS), Ulei de Căneapă (CN) și Ulei de In (IN)) este prezentată în Tabelul 1.

Tabelul 1. Compoziția în acizii grași importanți a uleiurilor studiate

ACIZII GRAȘI	AR (Meddeb et al., <i>Int. J. mol. Sci</i> 2017 , 18(12), 2582-95)	MS (Di Serio et al., <i>Eur. J. Lipid Sci. Technol.</i> , 2016 , 118: 288-98)	CN (Leizer et al., <i>J. Nutraceuticals and Funct. Med. Foods</i> 2000 , 2(4), 35-53.)	FS (Akkaya et al., <i>J Food Sci Technol.</i> , 2018 , 55, 2318-25)	IN (Bayrak, et al., <i>Biotechnol. Biotechnol. Equip.</i> , 2010 , 24, 1836-42)
Acid Palmitic C16:0	5-7	12-15	6-9	5-7.6	4.5-5.5
Acid Stearic C18:0	4-5	2.1-2.7	2-3	2.7-6.5	4-6.5
Acid Oleic C18:1	15-22	64.4-72.7	10-16	14-49	19.5-28
Acid Linoleic C18:2	57-60	10.3-15	50-70	48.3-74	12.5-15.5
Acid Linolenic C18:3	0-1	0.6-0.9	15-25	0-0.3	49-56

Analiza HPLC

Analiza probelor de ulei comercial a fost efectuată cu ajutorul unui sistem cromatografic de lichide HPLC-DAD/RID. Condițiile experimentale utilizate au fost următoarele: coloană Europhore 100-5 (Lxd=250x4 mm) cu particule de dimetil-n-octadecilsilan (C18) cu diametrul de 5 μm (faza staționară), faza mobilă - ACN:acetonă=41:59, debitul fazei mobile 1 ml/minut, volumul de injecție 25 μl, durata analizei 30 minute. Detecția s-a realizat cu detectori DAD (210 nm) și RID. Probele de ulei analizate au fost amestecate cu faza mobilă până la dizolvarea completă, fără o tratare suplimentară.

Caracterizarea FTIR-ATR

Spectrele FTIR (Spectroscopia de absorbție în infraroșu cu Transformată Fourier) au fost obținute cu un spectrometru Perkin Elmer, Hamburg, Germania cu celulă ATR (reflexie totală atenuată) cu cristal de diamant, în domeniul spectral 4000 – 400 cm⁻¹, cu o rezoluție 4 cm⁻¹ și un număr de 32 de scanări. Probele de ulei au fost analizate direct, prin plasarea probei lichide pe cristal și înregistrarea spectrului, iar procesarea și evaluarea spectrelor a fost realizată ulterior cu ajutorul software-ului Origin 8.5.

Metoda HPLC este o tehnică larg utilizată pentru analiza uleiurilor vegetale. Cu ajutorul ei trigliceridele (TG) care intră în compoziția uleiului pot fi separate, totodată fiind posibilă

determinarea compoziției trigliceridelor din punct de vedere al resturilor de acizi grași. Folosind metoda prezentată, mono-, di- și trigliceridele (MG, DG, TG), precum și acizii grași liberi pot fi separate într-un interval de 25 de minute. Cromatogramele comparative a celor cinci uleiuri sunt prezentate în Figura 1. În cromatograma uleiului de armurariu pot fi puse în evidență două zone, prima până la aproximativ 9 min unde apar compuși cu masă mai mică (MG și DG), dar și trigliceridele cu un conținut mare de acid linolenic. În regiunea cuprinsă între aproximativ 9 și 25 de minute sunt grupuri de picuri intense corespunzătoare trigliceridelor. De asemenea poate fi ușor pusă în evidență similitudinea profilului trigliceridelor din uleiul de armurariu și cel de floarea soarelui (Figura 1, AR și MS). Aceeași concluzie poate fi făcută și în urma analizei compoziției de acizi grași din componența celor două uleiuri (Tabel 1). Pe de altă parte uleiul de floarea soarelui a fost mult mai intens studiat decât cel de armurariu, ceea ce poate ajuta la identificarea compoziției trigliceridelor. În acest fel primul pic intens în cromatograma uleiului de armurariu (9.9 min) este atribuit TG cu compoziția acizilor grași LLL (L – ac. linoleic), următoarele 2 picuri de la 11.7 și 12.4 min corespund OLL și PLL (O – ac. oleic, P – ac. palmitic), picurile de la 14 și 14,7 min corespund OLO și PLO și cele de la 16.5 și 17.7 respectiv pentru OOO și POO. (Noor Lida, H.M.D., Sundram, K., Siew, W.L., Aminah, A., Mamot, S., *J Amer Oil Chem Soc*, **2002**, 79, 1137–1144) În acest fel analiza HPLC confirmă un conținut ridicat al acidului linoleic, urmat de ac. oleic și ac. palmitic. Acidul stearic se găsește în proporție mică, iar picurile trigliceridelor care conțin ac. stearic apar la timpi de retenție mai mari de 20 de minute. După profilul trigliceridelor uleiurile de cânepă și în pot fi l fel grupate împreună. În cromatogramele acestor uleiuri picuri mai intense la timpi de retenție mai mici corespund trigliceridelor cu conținut ridicat de acid linolenic. (Rezanka, T., Sigler, K., *Current Analytical Chemistry*, **2007**, 3, 252 - 271)

Metodele chemometrice pentru analizele de rutină a uleiurilor devin tot mai populare, deoarece sunt mai ”verzi”, mai rapide și ieftine. Astfel de metode utilizează, de exemplu, spectrofotometria IR (ATR sau NIR) (Socaciu, C., Fetea, F., Ranga, F., Bunea, A., Dulf, F., Socaci, S., Pinte, A., *Appl. Sci.* **2020**, 10, 8695-8710). Există o corelare bună cu metodele cromatografice clasice în vederea determinării acizilor grași saturați, mononesaturați și polinesaturați (AGS, AGMN, AGPN (eng. SFA, MUFA, PUFA). În literatura de specialitate principalele benzi de absorbție în spectrele uleiurilor au fost atribuite. În Figura 2 sunt reprezentate spectrele uleiului de armurariu și uleiurilor comparate, normalizate la cea mai intensă bandă la 1745 cm⁻¹.

În spectrul IR al unui ulei se disting trei zone importante care sunt reprezentate în Figura 3 și corespund intervalului 900-1500 cm⁻¹, 1600-1780 cm⁻¹ și 2800-3070 cm⁻¹. În prima regiune sunt importante benzile în regiunea 1360-1380 cm⁻¹ unde sunt vibrațiile de alungire

specifice grupării --C--H (legată de gruparea --CH_3). Vibrațiile de deformare pentru aceleași grupări apar la 1159 cm^{-1} . Pentru gruparea esterică există în această regiune 2 vibrații specifice pentru gruparea C--C(=O)--O și O--C--C , dintre care prima este de obicei mai intensă. Prima bandă apare la 1276 cm^{-1} , iar a doua la 1030 cm^{-1} . Ambele sunt specifice trigliceridelor. Benzile asociate vibrațiilor O--C--O din alcoolii primari și secundari apar la $1090\text{--}1020\text{ cm}^{-1}$ respectiv 1100 cm^{-1} (1096 cm^{-1} în acest studiu).

În a doua regiune caracteristică spectrului apar trei benzi importante specifice vibrațiilor de alungire a grupărilor --C=C-- (cis) la 1653 cm^{-1} , a grupării carbonil din ester C=O la 1743 cm^{-1} , iar la număr de undă mai mic de aproximativ 1709 cm^{-1} este bandă pentru aceeași grupare, dar în acidul liber.

În ultima regiune de interes, la lungimi de undă mai mari întâlnim vibrații semnificative ale grupărilor =C--H (cis (mai intense) și trans), originare din fracțiile trigliceridelor la 3010 cm^{-1} și benzi mai intense la 2919 și 2846 cm^{-1} pentru vibrațiile de alungire --C--H din grupările CH_2 și CH_3 din lanțul alifatic al trigliceridelor. (Kachel, M., Matwijczuk, A., Przywara, A., Kraszkiewicz, A., Koszel, M., *Agricultural Engineering*, 2018, .22, 61-71).

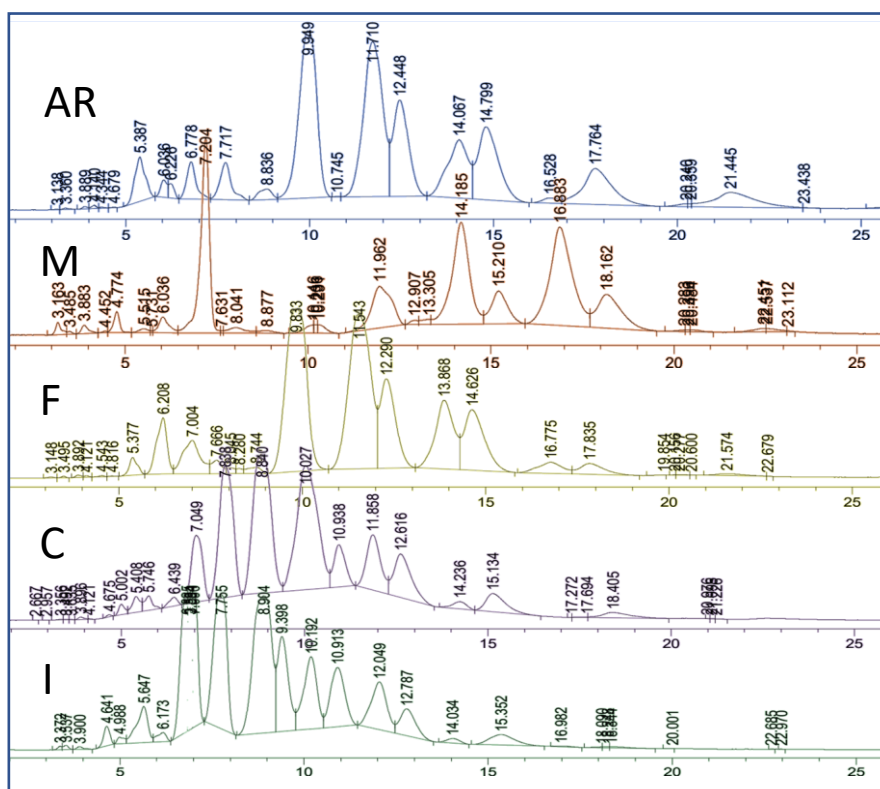


Figura 1. Cromatograme HPLC ale uleiurilor de AR, MS, FS, CN și IN

Cele 5 spectre obținute pot fi grupate în 3 clase analizând Figurile 3A și 3B. În prima clasă poate fi inclus uleiul de masline, care are un profil distinct atât HPLC cât și ATR și prezintă cea mai mică pondere de grupări -C=C- nesaturate. În celelalte doua clase pot fi grupate câte 2 uleiuri AR cu FS și CN cu IN. Spectrele lor sunt aproape suprapuse în regiunea

3010 cm^{-1} și 1450 cm^{-1} , din care se poate estima gradul de nesaturare al uleiului. Această concluzie este în acord cu analiza HPLC.

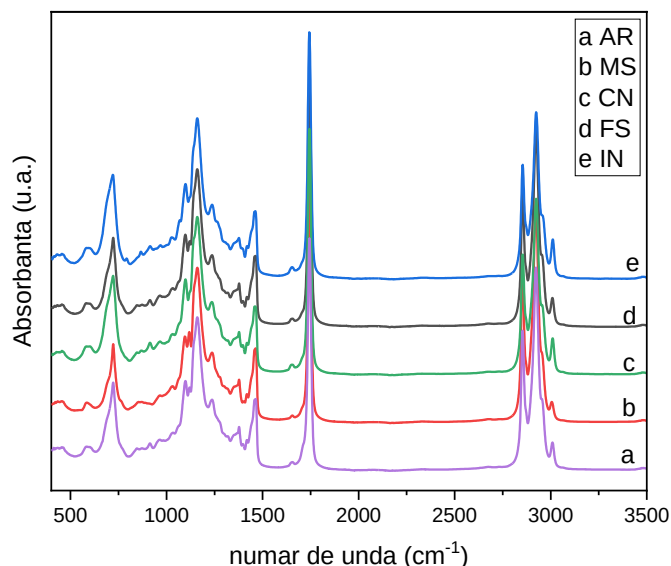


Figura 2. Spectrele ATR-FTIR normalizate pentru uleiurile de a) AR, b) MS, c) CN, d) FS, e) IN

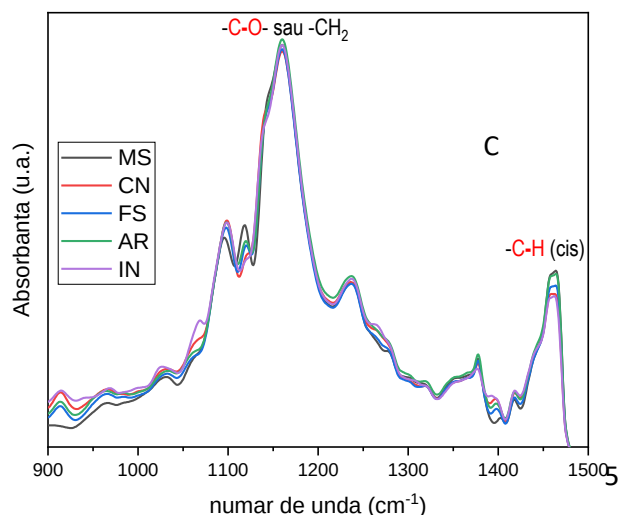
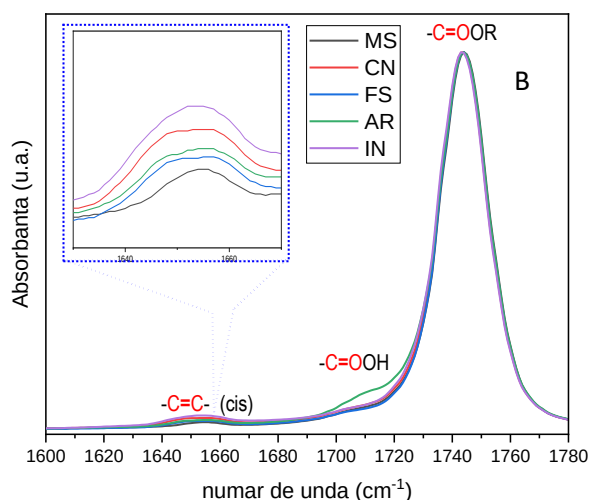
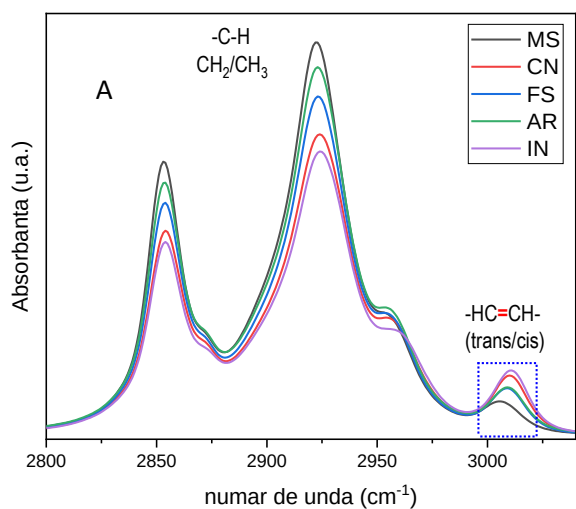


Figura 3. Spectrele ATR-FTIR pentru uleiurile studiate în regiunea A) $2800\text{--}3070\text{ cm}^{-1}$ B) $1600\text{--}1780\text{ cm}^{-1}$ C) $900\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$

1.2. Evaluarea activitatii antioxidante a uleiului de armurariu

Din datele analizelor HPLC și ATR se confirma prezența unei cantități mari de acid linoleic, urmat de acid oleic în compoziția uleiului de armurariu, similar cu uleiul de floarea soarelui. Deși studiile clinice au aratat că acești acizi grași nesaturați scad concentrația de colesterol seric, conținutul lor ridicat face uleiurile vegetale mai predispuse la oxidare, reprezentând o serie de reacții care conduc la rănțezirea uleiului. Pentru activitatea antioxidantă a uleiurilor vegetale sunt responsabili compușii fenolici, tocoferolii și alte specii care se regăsesc în uleiuri în cantități reduse. **Silimarina** este un complex de substanțe antioxidante (solidianin, silibina, etc), care reprezintă un element important al uleiului de armurariu. Pe lângă aceasta, uleiul de armurariu conține substanțe carotenoide și vitamine (E, B, D, K), precum și micro și macro-elemente. (Mhamdi B., Abbassi F., Smaoui A., Abdelly C., Marzouk B., Pak. J. Pharm. Sci., 29, 3, 951-959, 2016). Activitatea antioxidantă a acestor componente minore se exprimă în stabilitatea uleiului în timp și tratat termic și poate fi cuantificată prin măsurarea *indicii de peroxid (IP)*. Indicele de peroxid este o măsură a conținutului de peroxid și alte substanțe oxidante dintr-o cantitate anumită de ulei care oxidează iodura de potasiu, punând în libertate iodul și reprezintă o caracteristică de calitate a uleiurilor. IP indică starea acizilor grași nesaturați și crește odată cu alterarea uleiului și cu ponderea legăturilor nesaturate în compoziția uleiului. Cu toate acestea, cantități mici de antioxidanți prezenți în mod natural în ulei sau introduși ulterior pot avea activitatea antioxidantă și încetini procesul de rănțezire. IP este exprimat în miliechivalenți de peroxid pe kilogram de ulei (meq/kg). Pentru uleiurile proaspete acest indice este mai mic de 10 meq/kg, un ulei rănțed are valoarea IP mai mare de 20 meq/kg.

Determinarea IP

Pentru determinarea IP 1 g de ulei a fost amestecat cu 20ml amestec chloroform:ac. acetic glacial 2:1 și 1g KI. După 30 de minute au fost adăugați 50 ml de apă. Excesul de iod a fost titrat cu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.05N în prezența indicatorului amidon. IP a fost calculat folosind relația:

$$Ip = 1000 \cdot (B - S) \cdot N / W$$

unde B = volumul în ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ folosit pentru control (blanc), S = volumul în ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ folosit pentru proba, N = concentrația normală a $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, W = masa uleiului.

Schema reacției chimice care stă la baza determinării IP este reprezentată în Figura 4.

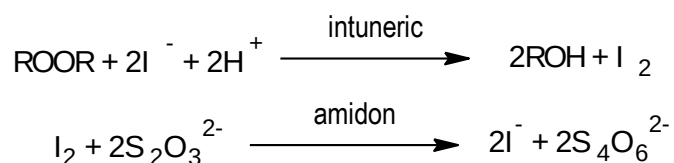


Figura 4. Reacția chimică pentru determinarea indicelui de peroxid

În Tabelul 2 sunt prezentate valorile IP ale uleiurilor analizate. Toate uleiurile au fost procurate și deschise în aceeași zi, iar de la deschiderea lor până la efectuarea analizei au trecut 5 luni. Uleiul de armurariu a fost tratat termic la 180 °C timp de 6 ore (ARt).

Tabel 2. Valorile indicelui de peroxid pentru uleiul de AR, MS, FS, CN și IN

	AR	ARt	MS	FS	CN	IN
IP (meq/kg)	9.9	10	9.95	16	10	5

Din datele prezentate în Tabelul 4 poate fi remarcată stabilitatea bună a uleiului de armurariu la oxidare. IP al lui este comparabil cu cel al uleiului de masline, care are cei mai puțini acizi grași nesaturați și prin urmare o stabilitate termică ridicată. Pe de altă parte uleiul de floarea soarelui cu o compoziție similară cu cea a uleiului de armurariu are un IP mult mai mare, ceea ce a influențat proprietățile sale organoleptice. Prin urmare componentele cu proprietăți antioxidante din compoziția uleiului de armurariu previn oxidarea acestuia, chiar dacă are un conținut mare de acid linoleic. În consecință IP al uleiului de armurariu tratat termic nu a suferit modificări. Se observă o stabilitate oxidativă complet diferită și la uleiurile de cânepă cu in cu un conținut ridicat de acid linolenic. Contrar așteptărilor uleiul de in are cel mai mic IP dintre uleiurile analizate. Conținutul de tocoferoli în uleiul de in este foarte mic în comparație cu uleiurile cu o compoziție similară. Alți compuși antioxidanți prezenți în uleiul de in, care asigură efectul antioxidant major, sunt acizi fenolici și lignani, similar cu uleiul de armurariu. (Barthet, V.J., Klensporf-Pawlik, D., Przybylski, R., *Canadian Journal of Plant Science.*, **2014**, 94, 593-602)

1.3. Caracterizarea proprietatilor biofizice ale uleiului de armurariu

Alte caracteristici importante ale uleiului de armurariu au fost determinate și comparate cu celelalte 4 uleiuri, reprezentate prin indicele de iod (Ii), indicele de saponificare (Is) și indicele de aciditate (Ia).

Metodele utilizare în fiecare caz sunt prezentate mai jos. Toate măsurătorile au fost efectuate în triplicat, la final făcându-se o medie a lor.

Ii – Indicele de iod sau cifra de iod reprezintă o măsură a gradului de nesaturare al uleiurilor, care se exprimă în grame de iod absorbit de 100 g produs. În acest scop 10ml de reactiv Wijs (iod-monoclorura) au fost amestecate cu 5ml etanol și 0,1g probă. După 30 de minute la întuneric au fost adăugați 10 ml de KI 10% titrat cu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.05N. Ii a fost calculat folosind relația de mai jos:

$Ii = 12.69 \cdot (B-S) \cdot N/W$, unde B=Volumul în ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ folosit pentru control, S = Volumul în ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ folosit pentru proba, N=concentrația normală a $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, W = masa uleiului.

Schema reacției este prezentată în Figura 5.

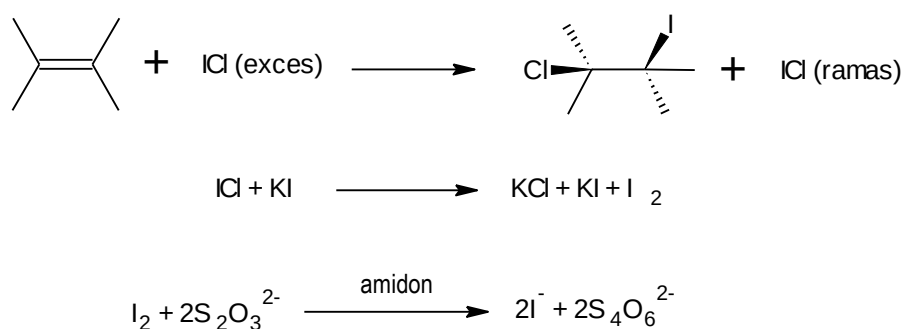


Figura 5. Schema reacțiilor chimice pentru determinarea indicelui de iod

Pentru determinarea gradului de nesaturare a acizilor grași din uleiurile vegetale, pe lângă metodele chimice clasice (titrimetrice) poate fi utilizată și metoda ATR. În acest scop fiecare spectru înregistrat a fost prelucrat în programul Origin 8.5. Inițial s-a efectuat corecția liniei de bază și ulterior deconvoluția spectrelor folosind funcția Lorentz. Aplicând raportul intensităților absorbanțelor A3009/A2925 se obține un coeficient N(ATR) care poate indica comparativ nesaturarea uleiurilor.

Is - Indice de saponificare reprezintă cantitatea în mg de KOH necesară pentru saponificarea 1g de ulei și este corelat masa moleculară medie a trigliceridelor. Pentru determinarea Is două grame de ulei au fost refluxate cu 25 mL de hidroxid de potasiu alcoolic

(0.5M) timp de o ora cu agitare continuă. Excesul alcalin a fost titrat cu acid clorhidric (0.5M) și 1mL de 25 fenoftaleina (indicator).

$I_s = 56.1 \cdot (B-S)N/W$, unde B = Volumul in ml de HCl folosit pentru blanc, S = Volumul in ml de HCl folosit pentru proba, N = concentratia normal a HCl, W = masa uleiului

Ia - Indice de aciditate reprezintă cantitatea în mg de KOH necesară pentru neutralizarea acizilor grași liberi din 1g de probă. În mod normal acizii grași liberi se formează prin descompunerea gliceridelor. Doua grame de probă au fost dizolvate în 25mL dietil eter și 25 mL de etanol și au fost titrate cu o soluție de KOH 0.1M în prezența fenoftaleinei. Schema reacției pentru determinarea Is și Ia este prezentată în Figura 6, cu diferență că în cazul Is reacția are loc la temperatură și acizii grași provin din hidroliza trigliceridelor.

$I_a = \%FFA \cdot 1.99$ FFA (acizi grași liberi ca acid oleic) = $V \cdot N \cdot 28,2/W$, unde V= volumul in ml de KOH folosit, N = concentratia normal a KOH, W = masa uleiului.

Indicele de esteri a fost calculat din relația $I_e = I_s - I_a$.

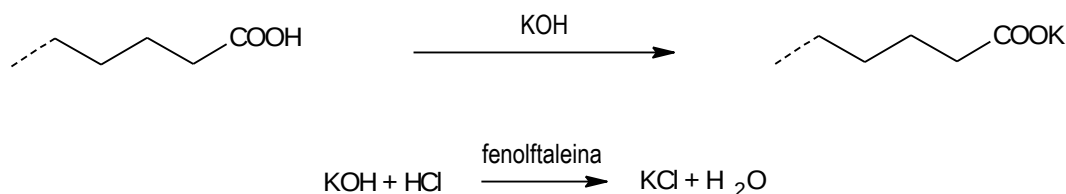


Figura 6. Schema reacției pentru determinarea Is și Ia

Valorile parametrilor fizico-chimici ai celor 5 tipuri de ulei sunt prezentate în Tabelul 3.

Tabelul 3. Parametrii fizico-chimici determinati pentru probele de ulei

indicii	MS	AR	FS	CN	IN
Ii	59	109	124	139	154
N(ATR)	0.086	0.161	0.178	0.279	0.33
Is	196.6	196.7	198	196.8	195
Ia	1.06	3.96	0.2	1.18	1.19
Ie	195.54	192.74	197.8	195.62	193.81

Uleiurile au fost aranjate în ordinea creșterii indicelui de nesaturare de la uleiul MS cu o valoare de 59 la uleiul de IN cu valoarea de 154 (Tabelul 3). Uleiul de armurariu fiind al doilea după gradul de nesaturare, fiind apropiat ca valoare de uleiul de floarea soarelui. Acest lucru rezultă și din compoziția similară a acizilor, care a fost discutată la punctul 1.1.

Nesaturarea exprimată din raportul absorbanelor măsurate la ATR este în acord cu determinarea chimică și indică același trend. Creșterea nesaturării de la MS-IN poate fi observat și din creșterea intensității absorbanelor specifice vibrațiilor grupărilor $-C=C-$ în Figura 3. Nesaturarea are o importanță deosebită atât pentru proprietățile fizice, cât și pentru reactivitatea chimică la dubla legătură. De asemenea gradul de nesaturare mare sugerează faptul că punctele de topire și fum ale uleiurilor respective vor fi înalte.

În seria uleiurilor studiate valoarea pentru indicele de saponificare nu variază foarte mult, indicând o distribuție uniformă a maselor moleculare. Uleiul de armurariu are o masă similară cu uleiul de măsline și cânepă. Mult mai important pentru proprietățile uleiului este indicele de aciditate și respectiv indicele de esteri. Ia indică prezența și cantitatea acizilor grași liberi, iar Ie este invers proporțional și arată ponderea legăturilor esterice. În acord cu standardele Codex Alimentarius pentru uleiul presat la rece valoare Ia normală nu depășește 4. Dintre uleiurile analizate uleiul de armurariu are cel mai mare indice de aciditate. Acest lucru poate fi confirmat și de valoarea absorbției mai mare în spectrul ATR al uleiului de armurariu la număr de undă 1710 cm^{-1} (Figura 3b), unde sunt prezente grupările $-COOH$. Un număr mai mare de acizi grași liberi poate fi rezultatul prezenței enzimelor sau/și a cantității de apă mai mare, de exemplu în semințele din care este extras uleiul.

1.4. Caracterizarea funcțională a lipazelor microbiene active la temperaturi scăzute

Bacteria *Psychrobacter* SC65A.3 izolată de curând din ghetarul Pesterii Scarisoara (Romania) a fost utilizată pentru producerea extracelulară a lipazelor cu activitate enzimatică la temperaturi scăzute. *Psychrobacter* SC65A.3 a fost identificată pe baza secvenței genei 16S ARNr și confirmată în urma secvențierii genomice (Macrogen, Seul, Korea). Tulpina bacteriană a fost cultivată în mediu lichid R2B la 15°C timp de 3 zile. Pentru optimizarea producției de enzime extracelulare cu activitate lipolitică au fost testate diferite condiții de creștere în prezența 1% Tween 80 și 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1% ulei vegetal de măsline/floarea soarelui și 0.001% Rodamina B adăugat mediului solid R2A. În urma incubării la 15°C timp de 3 zile, activitatea lipolitică extracelulară a fost evidențiată prin formarea produsilor specifici de tipul oleat de calciu (precipitat alb) sau complex Rodamina B hidrolizată (cu proprietăți fluorescente) în urma hidrolizei (Figura 7, Figura 8).

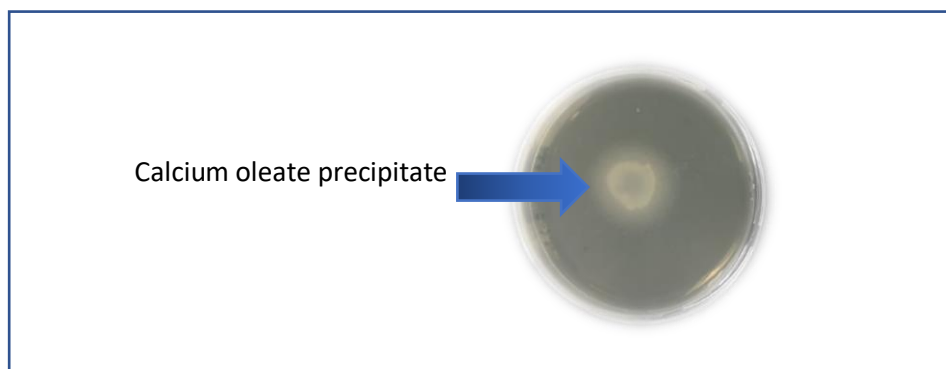


Figura 7. Evidentierea activitatii lipolitice prin formarea precipitatului oleat de calciu (Tween 80 substrat)

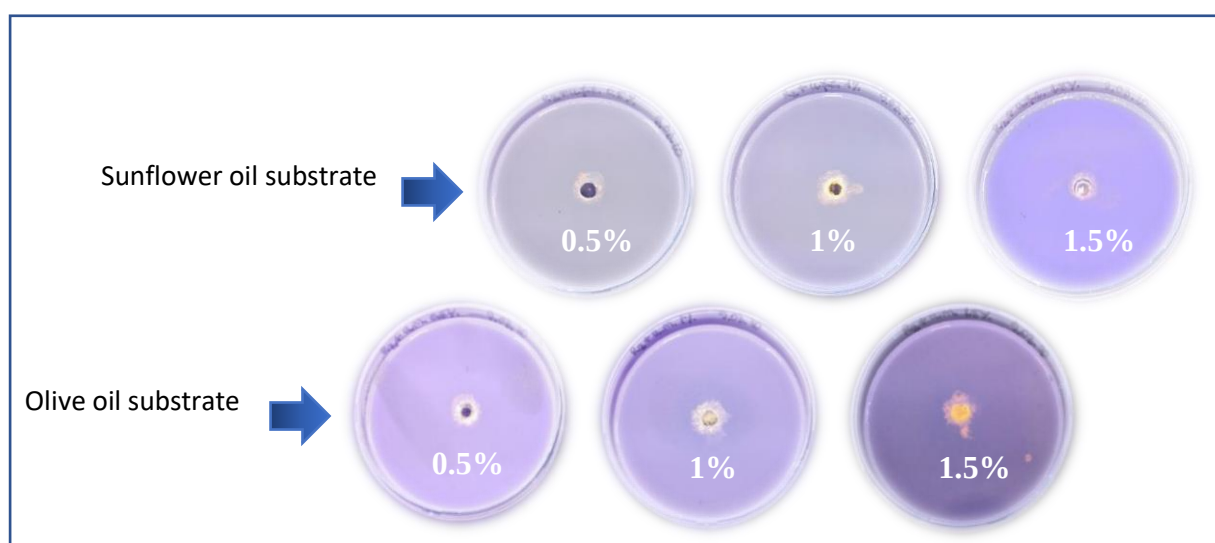


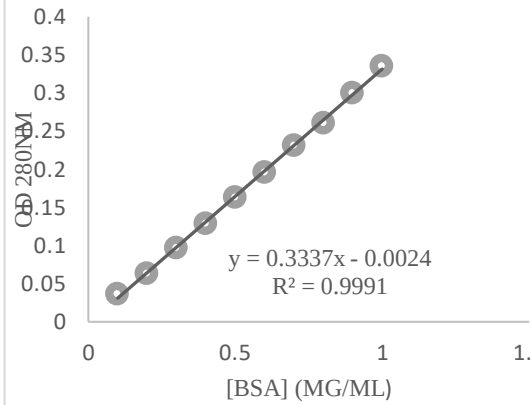
Figura 8. Evidentierea activitatii lipolitice prin metoda Rodaminei B (testarea uleiului vegetal ca substrat)

Metoda de evidentiere a activitatii lipolitice folosind sare de calciu implica formarea oleatului de calciu sub forma de precipitat alb, vizibil. Acest lucru a fost observat in substratul Tween 80, cu formarea unei zone concentrice de culoare alba indicand cristale de oleat de calciu formate dupa 7 zile dupa inoculare (Figura7). Diametrul zonei colorate este considerat direct proportional cu intensitatea activitatii enzimatic urmarita.

Prezenta uleiurilor vegetale de masline si de floarea-soarelui ca substrat au indicat o activitate lipolitica extracelulara in cazul ambelor substrate adaugate (Figura 8). In urma hidrolizei acestor uleiuri de catre lipazele bacteriene, produsul rezultat a interactionat cu 0.001% Rodamina B cu formarea unui compus fluorescent (350 nm). Activitatea lipazica a fost

evidentiata in prezenta tuturor concentratiilor testate in cazul ambelor substraturi, cu producerea celei mai mari cantitati de enzime extracelulare cu activitate lipolitica in cazul adaosului de 1% ulei vegetal masline/floarea-soarelui in mediul de cultura (Figura 8).

Pentru obtinerea extractului proteic, *Psychrobacter SC65A.3* a fost cultivat in mediu R2B (500 mL) la 15 °C timp de 3 zile. Faza extracelulara a fost centrifugata (4800 rpm) 20 min la 4 °C, iar supernatantul obtinut a fost supus precipitarii cu 80 % acetona (2:1, v/v raportat la mediul de cultura) (Figura9). Dupa centrifugare (10,000 rpm, 10 min) precipitatul proteic a fost resuspendat in 100 mM TRIS-HCl pH8. Fractia solubila obtinuta a fost analizata spectrophotometric (280 nm) pentru calcularea concentratiei proteice prin metoda BSA utilizand curba standard (Figura 10). Valorile concentratiei de protein ale fractiilor rezultate s-au incadrat in intervalul 5-8 mg/mL.

	
Figura 9. Precipitarea fractiei proteice din supernatantul biologic	Figura 10. Curba de calibrare BSA

Determinarea activitatii lipolitice a fractiei proteice obtinute s-a efectuat prin metoda colorimetrica utilizand p-nitrofenil butiric (p-NPB) drept substrat. Amestecul de reactie continand 2.5 mM p-NPB dizolvat in etanol, 1:4 v/v extract proteic si 32.5 mM Tris-HCl (pH7.5) a fost incubat 30 min la 25 °C/ 37 °C. Stoparea reactiei s-a realizat prin adaugare unei solutii de 20 mM NaCO₃, iar absorbanta produsilor de reactie a fost masurata la 347 nm. Activitatea lipolitica a fost calculata pe baza curbei de calibrare pentru p-nitrofenol in intervalul de concentratii de 0.1-0.5 mM (Figura 11). Activitatea enzimatica a fost exprimata in μmol/min/mg proteina (1U = 1 μmol/min).

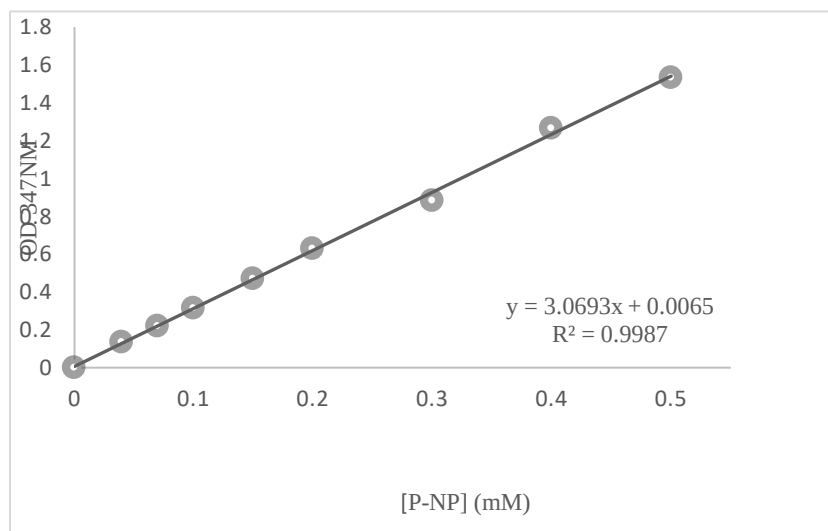


Figura 11. Curba de calibrare p-nitrofenol

Activitatea lipazica a fractiei proteice extracelulare masurata la 25 °C si 37 °C corespunde unor valori de 4.4 U/mg si respectiv 5.2 U/mg, sugerand o activitate catalitica adaptata la temperaturi scazute cu o crestere doar de 18% in urma cresterii temperaturii cu 12°C.

1.5 Managementul proiectului

Web site proiect: <https://www.ibiol.ro/proiecte/PNIII/SYMPLUS/index.html>