

**RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC AL PROIECTULUI**  
**DEZVOLTAREA UNOR BIOCATALIZATORI NOI PENTRU OBTINEREA ECONOMICA A UNOR**  
**SINTONI CHIRALI (SYNBIOCAT), COD PN-II-PT-PCCA-2011-3.1-1268, contract 124/2012**

**ETAPA I. IZOLARE SI CARACTERIZARE ENZIME**

Obiectiv 1. Izolarea enzimelor

Obiectiv 2. Determinarea activitatii enzimaticice

**Rezumatul etapei**

Eforturile depuse in ultimele decenii pentru descoperirea unor biocatalizatori eficienti în diverse domenii<sup>1</sup> s-au materializat într-un numar impresionant de publicații care descriu purificarea și caracterizarea acestor noi surse naturale de biocatalizatori. O atentie deosebita s-a acordat in acest context enzimelor de proveniență termofilă, cu precădere celor hidrolitice, care pot avea proprietăți biocatalitice speciale (activitate si selectivitate inalta in conditii extreme de temperatura si chiar pH).

Cea mai importanta contributie stiintifica care poate fi raportata in aceasta etapa o reprezinta obtinerea unui nou preparat enzimatic cu actiune hidrolitica (esterazica/ lipazica) din *Anoxybacillus flavithermus*, izolata din apele termale din NV Romaniei. Au fost parcurse in acest scop urmatoarele etape:

1. Izolarea, identificarea si caracterizarea unei tulpini bacteriene, sursa unei enzime hidrolitice termostabile
2. Purificarea enzimei native
3. Clonarea și caracterizarea Est/Lip termostabilă din *Anoxybacillus flavithermus* T1
4. Optimizarea exprimării și a purificării proteice
5. Testarea potentialului aplicativ al Est/Lip recombinată din *A.flavithermus* T1 în biotransformari selective

In plus, pentru determinarea activitatii enzimei studiate si a altor enzime cu actiune hidrolitica similara, a fost efectuat un studiu detaliat al metodei general utilizate, respectiv hidroliza esterilorlor cu *p*-nitrofenol (*p*NPA- acetat de *p*-nitrofenol, *p*NPP- propionate de *p*-nitrofenil).

***Obiectiv 1. Izolarea enzimelor***

**1. IZOLAREA, IDENTIFICAREA SI CARACTERIZAREA UNEI TULPINI BACTERIENE, SURSA UNEI ENZIME HIDROLITICE TERMOSTABILE**

Au fost selectate patru izvoare de ape termale:

- Tășnad (72°C) din Satu-Mare
- Andrid (90°C) din Satu-Mare
- Săcuieni (80-84°C) din Bihor
- Marghita (70°C) din Bihor

Probele de apă din locațiile alese au fost transportate de la fiecare locație în recipiente termostatate sterile și cultivate pe mediu LB-agar. De pe cele 4 plăci obținute, câte una pentru fiecare zonă a fost apoi crescută câte o colonie în mediu LB-lichid. Activitatea lipolitică a fost urmărită utilizând *p*-nitrofenil palmitat drept substrat, iar preparatul enzimatic din această etapă a fost supernatantul celular (Tabelul 1).

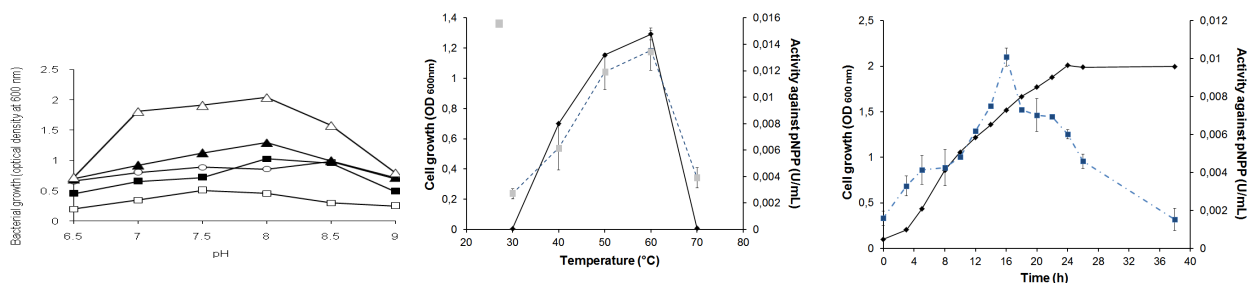
Colonia izolată din proba din izvorul termal din Tășnad a prezentat cea mai mare activitate lipolitică extracelulară, astfel acesta a fost ales pentru experimentele ulterioare. Caracteristicile morfologice și biochimice ale tulpinii bacteriene izolate au fost evaluate concomitent cu determinarea genetică a bacteriei. Analiza genetică a indicat o tulpina de *Anoxybacillus flavithermus* (identitate maximă obținută față de *Anoxybacillus flavithermus* AE3). Ulterior, tulpina complet caracterizata a fost depusă la Colecția Națională de Microorganisme Agricole și Industriale din Budapesta, Ungaria, având numărul de acces NCAIM B 02482.

**Tabelul 1.** Activitatea lipolitica a supernatantului celular pentru cele 4 culturi testate

<i>Sursa</i>	<i>Activitatea*10<sup>3</sup> (U/mL)</i>
Tășnad	227
Andrid	75
Săcuieni	210
Marghita	219

Producția carboxi-esterazei de catre *Anoxybacillus flavithermus* T1 a fost monitorizată prin modificarea temperaturii și pH-ului in etapa de crestere. Se observa in Fig. 1A ca temperatura favorizeaza dinamica biomasei si, indiferent de temperatura,

creșterea este maximă la pH 8.0. Secreția maximă de enzimă (Fig. 1B) a fost înregistrată la o temperatură de 60°C, la pH 8 după 16 h de creștere celulară.



**Fig. 1.** Influența pH-ului și temperaturii asupra creșterii celulare și a producției de enzimă. A. Efectul pH-ului asupra creșterii celulare la diferite temperaturi: □ 40°C; ■ 45°C; ○ 50°C; ▲ 55°C; △ 60°C; B. Creșterea celulară (◆) și producția de hidrolază (■) la pH 8.0, la diferite temperaturi

**Fig. 2.** Variația în timp a creșterii celulare (◆) și a activității hidrolazice extracelulare (■)

Durata optimă a procesului s-a determinat prin monitorizarea în timp a creșterii celulare și a activității hidrolazice în condițiile optime determinate (pH 8.0 și 60 °C). Se observă în Fig. 2 că densitatea celulară maximă se atinge după 24 ore, dar activitatea hidrolazică extracelulară maximă se obține la 16 ore, după care ea scade semnificativ.

De asemenea, s-a încercat favorizarea producerii de enzimă 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. Creșterea concentrației acestuia, studiată în intervalul 0.25% la 3% ,nu a determinat îmbunătățirea activității hidrolazice a supernatantului celular.

**Tabelul 2.** Efectul adaosului de uleiuri vegetale (1.5% vol) în mediul LB standard asupra creșterii și activității hidrolazice

Mediu	OD <sub>600</sub>	Activitate x10 <sup>3</sup> (U/mL)
Control (mediu LB fara adaos de ulei)	1.56	2.25
Ulei de floarea soarelui	1.65	16.10
Ulei de masline	1.61	8.29
Ulei de parmier	1.43	13.71

## 2. PURIFICAREA ENZIMEI NATIVE

S-a realizat în continuare purificarea enzimei (Est/Lip) native din *A. flavithermus* T1 în etapele clasice: precipitare cu sulfat de amoniu și acetona (purificarea grosieră) și cromatografie de schimb ionic și hidrofobă (purificarea avansată). Ca o contribuție originală, s-a introdus în protocolul de purificare o etapă de precipitare specifică a lipazelor, utilizată anterior de către Gorokhova<sup>2</sup> doar ca metodă de imobilizare și activare a lipazelor.

### A. PURIFICAREA GROSIERA A ENZIMEI

Prin centrifugarea unei culturi de 22-24 ore (7,000 rpm, 20 min) s-a obținut supernatantul care, după filtrare pe o membrană de 0.45 μm a permis obținerea unei soluții libere de celule utilizată în continuare.

#### 1. Precipitarea cu sulfat de amoniu

În soluția de enzimă se adaugă sub agitare la 4°C sulfat de amoniu până la o saturatie de 30%. Precipitatul separat prin centrifugare la 14.000 rpm timp de 15 min se resuspendă în tampon Tris 50 mM pH 8. Procedura se repetă până la saturatii de 40%, respectiv 70%.

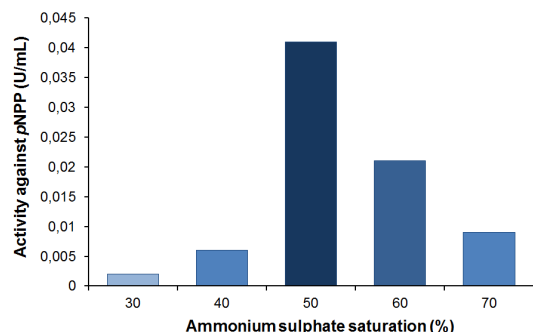
După resuspenderea produsului solid, soluția se supune dializei peste noapte față de 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) la 4°C.

#### 2. Precipitarea cu acetona

În soluția brută de enzimă obținută se adaugă la rece în picături 1, 4 sau 9 volume de acetona răcită sub agitare continuă. După perfectarea precipitării la -20°C sau la 4°C se izolează precipitatul prin centrifugare (14.000 rpm, 15 min, 0°C), se usucă produsul la temperatura camerei 60 min și se resuspendă în soluție 50 mM Tris-HCl, pH 8.0.

Activitatea hidrolazică a soluțiilor obținute se determină la 60°C cu pNPP, timp de 5 (pentru soluțiile obținute prin precipitare) respectiv 60 min (în cazul supernatantului brut, mai puțin activ). Se observă (Fig. 3) că utilizarea unei saturatii de

50% in sulfat de amoniu permite obtinerea celei mai active solutii. Chiar si in aceste conditii, activitatea este insa extrem de scazuta iar termostabilitatea preparatului enzimatic redusa.



**Fig. 3.** Optimizarea purificarii grosiere prin precipitare cu sulfat de amoniu

**Tabelul 3.** Optimizarea etapei de purificare grosiera prin precipitare cu acetona

Raport vol. <i>acetona:supernatant</i>	Activitate (U/mL)			
	2h, 4°C	2h, -20°C	24 h, 4°C	24 h, -20°C
2:1	0.06	0.04	0.03	0.05
4:1	0.07	0.08	0.05	0.03
6:1	0.05	0.08	0.03	0.07
8:1	0.06	0.05	0.05	0.07

In cazul precipitarii cu acetona cel mai activ s-a dovedit a fi produsul obtinut la utilizarea unui raport volumetric de 4:1, dupa 2 ore racier la -20°C. Rezultate asemanatoare au dat si produsul obtinut similar cu un raport 6:1. Cresterea concentratiei de acetone si a duratei de perfectare a precipitarii nu au permis imbunatatiri ale activitatii, deci sunt costuri suplimentare inutile (Tabelul 3). O comparatie a activitatii preparatelor enzimactice obtinute arata (Tabelul 4) calitatea superioara a produsului obtinut prin precipitare cu acetona.

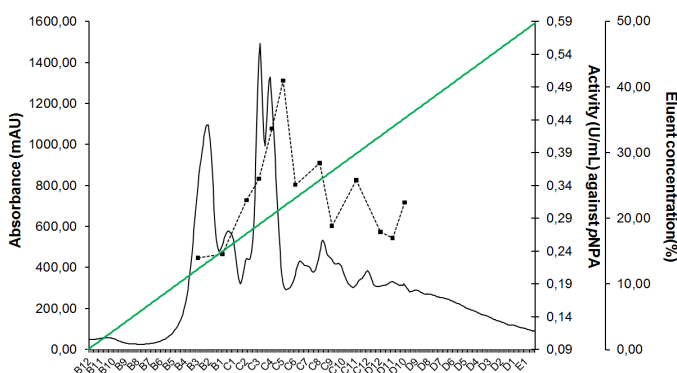
**Tabelul 4.** Activitatea hidrolazica a preparatelor enzimactice (metoda pNPP)

Preparat	Extract celular brut	Precipitare cu sulfat de amoniu	Precipitare cu acetona
Activitate (U/mL)	0.12	0.032	<b>0.252</b>

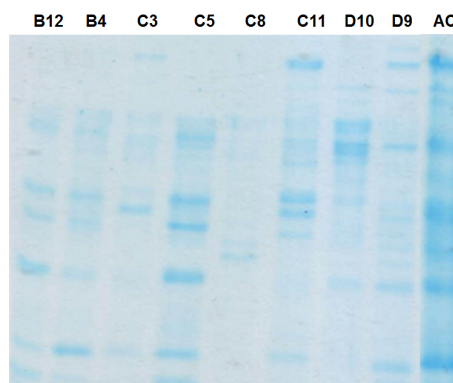
## B. PURIFICAREA CROMATOGRAFICA A ENZIMEI BRUTE

### A. Cromatografia de schimb anionic

Fiecare din precipitatele obtinute anterior se resuspenda si dupa filtrare pe o membrana de 0.22 µm se cromatografiază pe o coloana de schimb anionic (HiLoad 16/10 Sepharose High Performance), echilibrata in prealabil cu solutie tampon 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. Eluarea proteinei se realizeaza cu amestec de 50 mM Tris-HCl si 100 mM NaCl pH 8.0, gradient liniar. Pentru analiza fractiilor se impune eliminarea prealabila a sarurilor prin dializa (in solutie 50 mM Tris-HCl, pH 8.0), pentru a elimina orice interferente posibile. Determinarea activitatii enzimactice s-a realizat cu pNPA.



**Fig. 4.** Diagrama de elutie pe coloana de schimb anionic  
 — absorbanta la 280 nm  
 ■ activitatea enzimatica a fractiei (determinate cu pNPA)  
 — cresterea concentratiei sarii in eluent

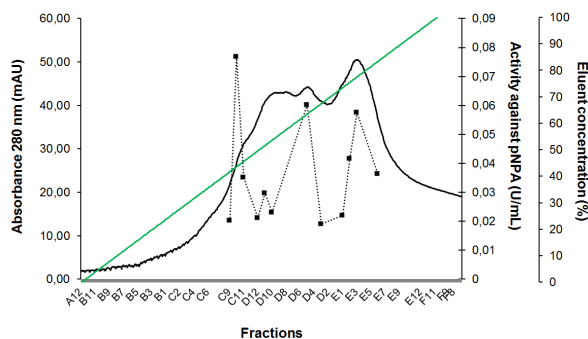


**Fig. 5.** Separarea proteinelor din fractiile cu activitate enzimatica: C3, C5, C8, C11, D10 comparativ cu pudra acetonica inainte de purificarea cromatografica (AC)

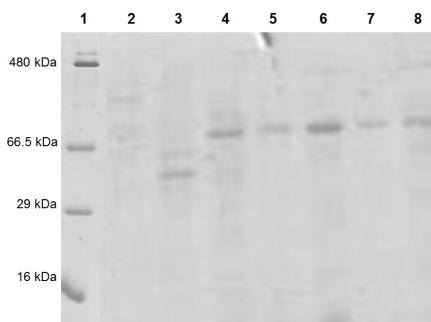
Analiza SDS-PAGE a fractiilor cu activitate enzimatica semnificativa a evidentiat existenta unui amestec complex de proteine in fiecare din ele. Tinand cont si de nivelul redus al activitatii, s-a concluzionat ca aceasta varianta de purificare nu corespunde scopului urmarit.

## B. Cromatografia hidrofoba

Pudra acetonica obtinuta se resuspenda in tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8 si se amesteca cu o solutie de sulfat de amoniu pana la o concentratie finala de 1.6 mM. Separarea se face pe o coloana hidrofoba (cu fenil-sefaroza), echilibrata in prealabil cu aceeasi solutie tampon iar eluarea cu solutie Tris-HCl 50 mM, pH 8.0. In fiecare fractie separata s-a determinat activitatea enzimatica si s-a analizat prin SDS-PAGE.



**Fig. 6.** Diagrama de elutie pe coloana hidrofoba  
 \_\_\_\_\_ absorbanta la 280 nm  
 ■ activitatea enzimatica a fractiei (determinate cu pNPP)  
 \_\_\_\_\_ cresterea concentratiei Tris-HCl pH 8.0 in eluent

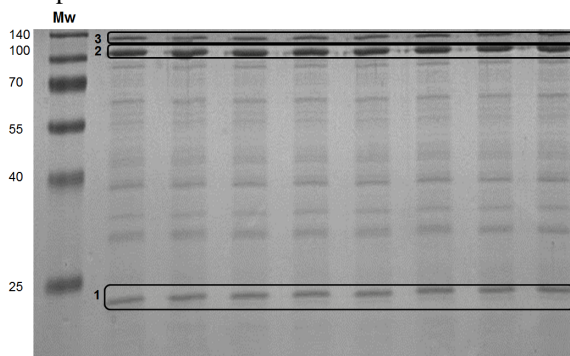


**Fig. 7.** Analiza SDS-PAGE a fractiilor izolate prin cromatografie hidrofoba (1. MW; 2:C10\*; 3:D5\*; 4:D1; 5: E2\*; 6:E4; 7:E5; 8:E6\*(cele cu activitate enzimatica semnalizate \*)

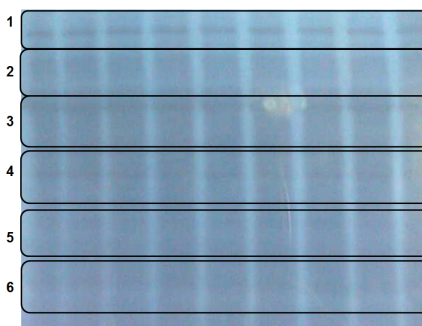
## C. PURIFICAREA ENZIMEI CU AGENTI SPECIFICI DE PRECIPITARE

Gorokhova a descris in literatura<sup>3</sup> faptul ca precipitarea unor compusi hidrofobi (*N*-cetilamina- CeNH<sub>2</sub> sau *N*-cetilacetamida- CeA in amestec apa-acetona in prezenta unor lipaze poate conduce si la coprecipitarea enzimei. Pe baza acestei observatii a fost efectuat un studiu comparativ folosind CeNH<sub>2</sub> sau CeA ca si coprecipitant.

Solutia obtinuta din 20 mg agent de coprecipitare dizolvata in 700 μL acetona fierbinte (40-50°C) s-a adaugat in 10 mL solutie acetonica de precipitat acetonic brut care contine 0.08-0.1 mg proteina totala /mL. Dupa evaporarea acetonei amestecul a fost mentinut la 4°C timp de 24 ore. Faza solida separata (care contin proteina coprecipitata de-a lungul compusului hidrofob se separa prin centrifugare (8,000 rpm, 20 min) si apoi se resuspenda in Tris-HCl 50 mM, pH 8.0. Activitatea enzimatica se determina cu pNPP. Puritatea supernatantului si a coprecipitatului obtinut se determina electroforetic prin SDS-PAGE.



**Fig. 8.** Analiza proteinelor dupa coprecipitare cu cetilamina prin metoda SDS-PAGE.



**Fig. 9.** Separarea SDS-PAGE preparativa

Se observa (Fig. 8) ca utilizarea coprecipitarii nu este selectiva, un numar mare de proteine fiind de asemenea precipitate in prezenta aminei hidrofobe. Activitatea enzimatica determinata nu a condus la rezultate reproductibile si interpretabile, probabil datorita interferentelor cu agentii de coprecipitare. Din gelul rezultat au fost utilizate benzile de intensitate maxima si cele specifice enzimei studiate (evidentiate in chenar in Fig. 8). Analiza a aratat insa ca toate proteinele analizate sunt oligomeri ai stratului S, o glicoproteina care imbraca celula bacteriana la foarte multe specii.

## D. PURIFICAREA PRIN SDS-PAGE PREPARATIV

S-a realizat si o separare preparativa (Fig. 9). Gelul rezultat a fost impartit in 6 benzi. Cele mai active s-au dovedit a fi benzile compusilor cu mase moleculare mari (banda 1 si 2 in Fig. 9), dar nu numai (Banda 4 si 6 in Fig. 9). Acest lucru poate fi

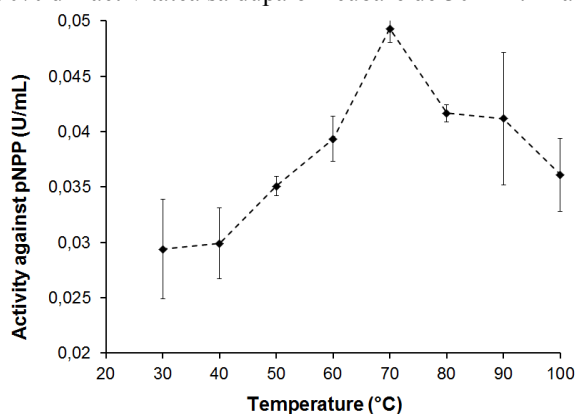
explicat atat prin existenta unor agregate cu diferite mase moleculare (cu activitate scazuta), cat si prin prezenta mai multor enzime hidrolitice cu activitati diferite la hidroliza esterilor pNP.

**Tabelul 5.** Activitatea probelor obtinute prin SDS-PAGE preparativ

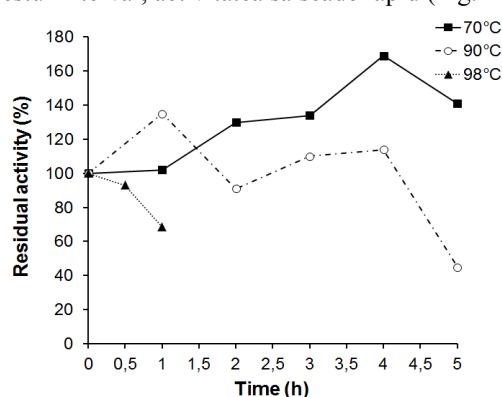
Substrat (solutie stoc 5 mM)/Banda	Activitate*10 <sup>3</sup> (U/mL)					
	1	2	3	4	5	6
pNPA	14,9	0,8	1,01	3,19	0,2	1,9
pNPP	0,87	2,19	1,3	1,4	1,4	3,2

### E. CARACTERIZAREA BIOCHIMICA A PUDREI ACETONICE

Impedimentele ivite în etapele de purificare a enzimei hidrolitice prin metodele clasice sau prin precipitare specifică ne-au determinat să realizăm caracterizarea acesteia în stare parțial purificată. Astfel, preparatul enzimatic brut obtinut dupa precipitare cu acetona (pudra acetonica) este caracterizat de o temperatura optimă înaltă, circa 70°C (Fig. 10) și o stabilitate ridicată la temperaturi de până la 98°C unde isi pastreaza peste 70% din activitatea sa după o incubare de 30 min. În afara acestui interval, activitatea sa scade rapid (Fig. 11).

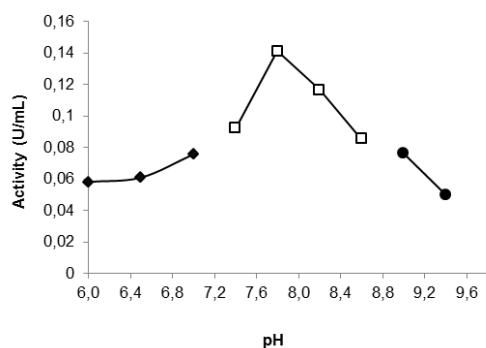


**Fig. 10.** Dependenta activitatii lipolitice a preparatului enzimatic de temperatura la pH 8

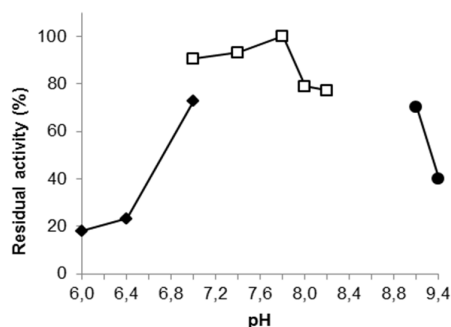


**Fig. 11.** Stabilitatea in timp a preparatului enzimatic la diferite temperaturi la pH 8

pH-ul optim este de 7.8 (Fig. 12), enzima fiind stabilă in domeniul slab alcalin (7.4-9.0), unde isi pastreaza circa 70% din activitatea maxima după 30 minute.



**Fig. 12.** Dependenta activitatii lipolitice a preparatului enzimatic de pH la 60°C

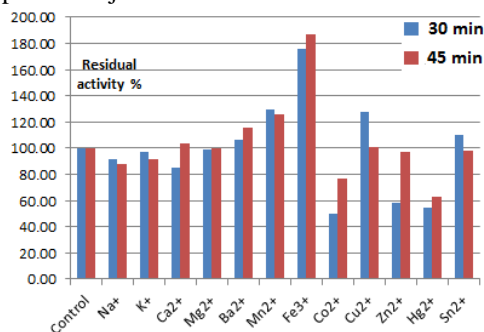


**Fig. 13.** Stabilitatea preparatului enzimatic la diferite valori ale pH-ului la 60°C

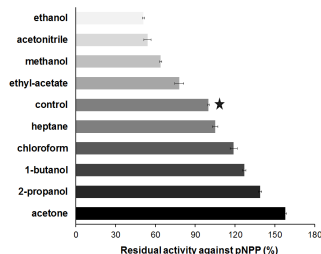
### Influenta cationilor

a fost studiată prin determinarea activitatii reziduale a enzimei după 30 respectiv 45 minute de preincubare la 60°C cu solutii ale clorurilor unor cationi, in concentratie finala de 1 mM (Fig. 14). Se observa ca ionii de Ba<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> si Cu<sup>2+</sup> determina

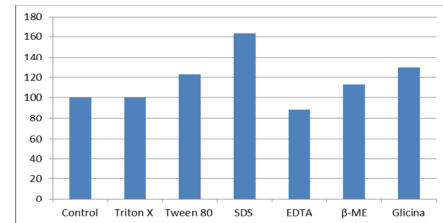
intensificarea activitatii hidrolazice, in timp ce toti ceilalti ioni testate nu modifica sau determina scaderea acesteia, actionand ca inhibitori. Interesant de semnalat este faptul ca  $Hg^{2+}$  determina o scadere de doar 50% a activitatii, desi toxicitatea sa pentru majoritatea enzimelor este cunoscuta.<sup>4</sup>



**Fig. 14.** Influenta ionilor metaici asupra activitatii enzimatice



**Fig. 15.** Influenta solventilor asupra activitatii enzimatice



**Fig. 16.** Efectul modulatorilor asupra activitatii enzimatice

### Solventii organici

Stabilitatea mare a carboxiesterazelor in solvent organici este binecunoscuta. Acest lucru a fost demonstrat si pentru pudra acetonica a enzimei studiate. Mai mult chiar, anumiti solventi (acetona, izopropanolul) au activat enzima chiar si la concentratii mari (50%) dupa un tratament de 15 ore la 30 °C. In schimb acetatul de etil, metanolul, etanolul si acetonitrilul au avut un efect inhibitor de la moderat la puternic (Fig. 15).

### Efectul modulatorilor

A fost studiat si efectul detergentilor si a altor compusi care pot adecta structura si functia enzimei studiate. Activitatea reziduala a fost determinata dupa incubarea timp de 30 min la 60°C in prezenta: Triton X-100, Tween-80, Na<sub>4</sub>-EDTA, β-mercaptoetanol (β-ME), dodecil-sulfat de sodiu (SDS) si glicina (1 mM concentratia finala). Detergenții nu au influentat sensibilactivitatea enzimatice, 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% (Fig. 16).

### Selectivitatea de substrat

Pentru stabilirea specificitatii de substrat a precipitatului acetonic brut au fost efectuate testele standard de activitate enzimatice pe urmatoarele substraturi: acetat, metoxiacetat, propionat, butanoat, metilbutanoat, palmitat si oleat de *p*-nitrofenil, monitorizand eliberarea *p*NP timp de 5 minute.

**Tabelul 6.** Selectivitatea de substrat a enzimei cu activitate lipolitica/esterazica

Substrat (25 μM)	Acetat	Propanoat	Butanoat	Metilbutanoat*	Palmitat	Oleat
Activitate x 10 <sup>3</sup> (U/mL)	34.3	35.5	9.0	10.0	35.9	39.4

\*substrat chiral

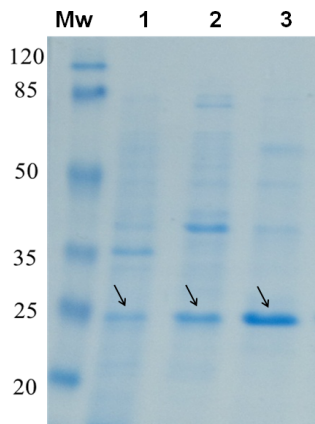
Faptul ca enzima prezinta activitate similara pentru mai multe tipuri de esteri ai acizilor carboxilici, atat cu catena hidrocarbonata scurta/medie cat si lunga, sugereaza prezenta in preparat a mai multor enzime hidrolitice cu proprietati diferite.

## 3. CLONAREA ȘI CARACTERIZAREA EST/LIP TERMOSTABILĂ DIN ANOXY-BACILLUS FLAVITHERMUS T1

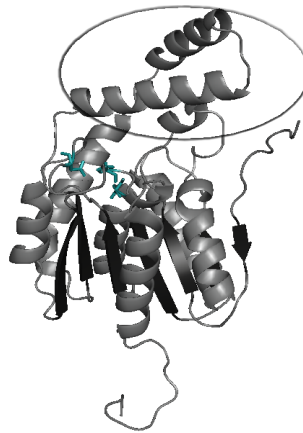
Impedimentele survenite în cadrul experimentelor de purificare a enzimei native ne-au determinat să realizăm clonarea genei enzimei studiate, folosind secvența determinată în prealabil a enzimei din genomul deja secvențat al tulpinii *A. flavithermus* W1<sup>5</sup>. Aceasta etapa a fost realizată în colaborare cu colectivul Prof. Dr. Vertesi de la centrul de cercetări în științele naturii al Academiei Maghiare de Științe din Budapesta, Ungaria.

În prima etapă au fost create secvențele primerilor pentru a clona gena enzimei de interes, cu ajutorul polimerazei MyTaq, iar apoi s-a realizat multiplicarea plasmidică sau exprimarea carboxil-esterazei cu ajutorul vectorului pET 20b (+) care a fost introdus ulterior în *E. coli* XL1 Blue sau *E. coli* BL21 DE3.

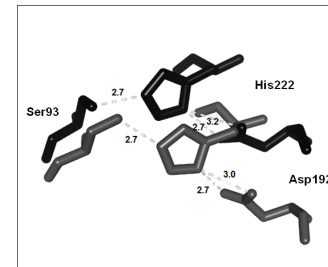
Est/Lip a fost purificată din spațiul periplasmic utilizând un procedeu în două etape indicat de producătorul Novagen. Acest procedeu implică destabilizarea membranelor și cromatografia de afinitate pe bază de Ni-agaroză. Fracțiunile obținute au fost analizate pe SDS-PAGE. Tabloul comparativ al fiecărei etape de purificare poate fi urmărit calitativ în Fig. 17.



**Fig.17.** Analiza SDS-PAGE ale enzimei clonate 1-extract brut din *E.coli* BL 21 DE3 la 5 h după inducția cu IPTG; 2- fracția eriplasmatică; 3: enzima purificată prin cromatografie de afinitate pe Ni<sup>2+</sup>-agaroză



**Fig. 18.** Modelul tridimensional al Est/Lip din *A. flavithermus* T1 alcătuit din  $\alpha$ -helixuri (în gri) și foi pliade  $\beta$ -strands (negru) cu evidențierea aminoacizilor catalitici.



**Fig. 19.** Aminoacizii situsului catalitic

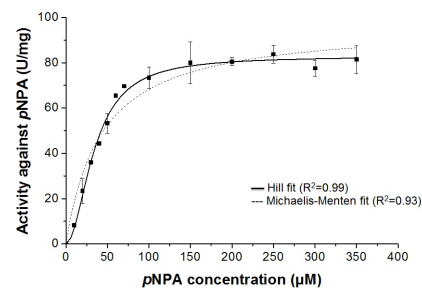
Analiza structurii tridimensionale a modelului Est/Lip izolată din tulpina *A.flavithermus* T1 s-a făcut pe baza similarității acestuia cu Est 30 din *Geobacillus stearothermophilus* a cărui structură cristalină a fost determinată.<sup>6</sup> Astfel s-a arătat că partea centrală a enzimei este compusă din șapte foi  $\beta$ -pliate, cu prima foaie  $\beta$ -pliată de la capătul *N*-terminal în poziție antiparalelă cu restul. Lidul este reprezentat ca o regiune distinctă de domeniul de bază, elicoidală fiind alcătuită din două  $\alpha$ -helixuri și un 310-helix (Fig. 18). Astfel, proteina prezintă structura specifică carboxiester-hidrolazelor, fiind formată din  $\alpha$ -helixuri și foi  $\beta$ -pliate. Prin comparație cu carboxi-esteraza din *Geobacillus stearothermophilus* mai sus menționată am propus drept amino acizi catalitici următorii: Ser 93, Asp 192 și His 222 (Fig. 19).

*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 determinată cu *p*NPA și 65°C atunci când *p*NPP a fost utilizat drept substrat.
- La 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<sup>2+</sup> a exercitat cel mai puternic efect inhibitor inactivând enzima complet iar în prezență de Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> și a Hg<sup>2+</sup> Est/Lip a reținut aproximativ 10% din activitatea inițială.
- Enzima și-a păstrat o mare parte din activitate (peste 60%) în prezență de 10% metanol și 10% DMSO. Creșterea concentrațiilor de metanol a dus însă la inactivarea Est/Lip pure. 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.

Substrat	$v_{max}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	<i>N</i>
<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	23.28 ± 2.32	0.12	0.0052	1.85±0.32

**Fig. 20.** Parametri cinetici pentru Est/Lip din *A. flavithermus* T1 față de *p*NPA and *p*NPP



- Testarea efectului unor detergenți asupra enzimei s-a realizat în prezență de dodecil-sulfat de sodiu (SDS), etilendiaminotetraacetatului de sodiu (EDTA), Triton X-100 și  $\beta$ -mercaptoetanol (bME). SDS în concentrații de 1-10-100  $\mu\text{M}$  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  $\mu$ M SDS, respectiv 0.01-0.05% Triton X-100), au avut un efect mai pronunțat de stabilizare termică. O concentrație de 1 mM  $\beta$ -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  $\beta$ -ME determina inactivarea completă a enzimei.

- La testarea specificității Est/Lip, s-a observat o diferență mare față de extractul enzimatic brut, obținându-se următoarele valori ale activității (U/mg): *p*NP - acetat:  $61.3 \pm 1.5$ ; *p*NP - propionat:  $84.1 \pm 3.4$ ; ***p*NP-butirat:  $167.1 \pm 2.7$** ; ***p*NP-metil butirat (substrat chirală):  $149.1 \pm 32.6$** ; *p*NP-caprate:  $73.6 \pm 2.9$ ; *p*NP-palmitat:  $1.4 \pm 0.3$ ; *p*NP-oleat:  $3.2 \pm 0.4$ ; trioleină: 14.3.

Au fost determinați și parametrii cinetici ai enzimei purificate (Fig. 20).

#### 4. Optimizarea exprimării și a purificării proteice

Clonarea și exprimarea proteinelor permite obținerea lor cu randamente superioare, simplificarea operațiilor de purificare și în consecință reducerea costurilor totale, așa cum s-a demonstrat și în cazul enzimei studiate de noi anterior<sup>7</sup>. În cazul proteinelor heteroloage, cele mai utilizate organisme sunt *Escherichia coli* și *Pichia pastoris*<sup>8</sup>. Principalul dezavantaj al acestor proceduri este efectul toxic pe care îl are plasmida care conține gena dorită cât și proteina biosintetizată care pot produce asupra celulei gazdă. E posibil de asemenea ca derivatul lactozei cu IPTG-ul folosit pentru inducția exprimării proteinei să prezinte toxicitate pentru cellule.

Principalul dezavantaj este exprimarea proteinelor într-o formă inactivă sau formarea unor agregate proteice intracelulare, hidrofobe, greu de eliberat ulterior<sup>9</sup>. Dacă proteina este intracelulară există și posibilitatea ca aceasta să fie asociată cu acizii nucleici. De aceea, varianta conducerii proteinelor în spațiul periplasmatic poate fi o soluție pentru eliminarea acestor dezavantaje și în plus procedura de purificare se simplifică<sup>10</sup>.

Pentru purificarea fracțiilor periplasmice este necesară mai întâi destabilizarea membranelor. Au fost testate mai multe metode: în câmp electrostatic, prin șoc osmotic, congelări și decongelări repetate sau mecanic<sup>11</sup>.

Exprimarea depinde și de vectorul utilizat pentru incorporarea genei proteinei de interes. Acesta trebuie să conțină un promotor suficient de puternic pentru a favoriza exprimarea în concentrații mari, dar în același timp să poată fi ușor de dezactivat pentru ca proteina produsă să nu afecteze creșterea celulei gazdă.

În ciuda acestor limitări, exprimarea proteinelor heteroloage în celule gazdă este o metodă des utilizată care asigură proceduri simplificate și reproductibile, comparativ cu proteinele native.

Mai întâi s-a realizat exprimarea în *E. coli* și purificarea unei hidrolaze de 25 kDa, cu activitate esterazică și lipazică (Est/Lip), dintr-o tulpină termofilă de *Anoxybacillus flavithermus* T1. Pe scurt, gena Est/Lip a fost introdusă într-un vector pET-20b(+) care conține și pelB leader, care favorizează transferul enzimei în spațiul periplasmatic.

Optimizarea procesului de exprimare a urmărit determinarea condițiilor experimentale referitor la: natura inductorului, concentrația IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside), temperatura și durata inducției, metodele de destabilizare membranară utilizate.

**Obținerea culturilor:** Celulele de *E. coli* BL DE 21 care conțin plasmida cu gena hidrolazei din *A. flavithermus* au fost multiplicat în 5 mL mediu LB timp de 12 ore la 37°C și 200 rpm. 100  $\mu$ L din precultura obținută au fost inoculate în 50 mL mediu LB steril care conține 100  $\mu$ g/mL ampicilină. Pentru cuantificarea creșterii celulare s-a determinat densitatea optică a soluției la 600 nm (OD).

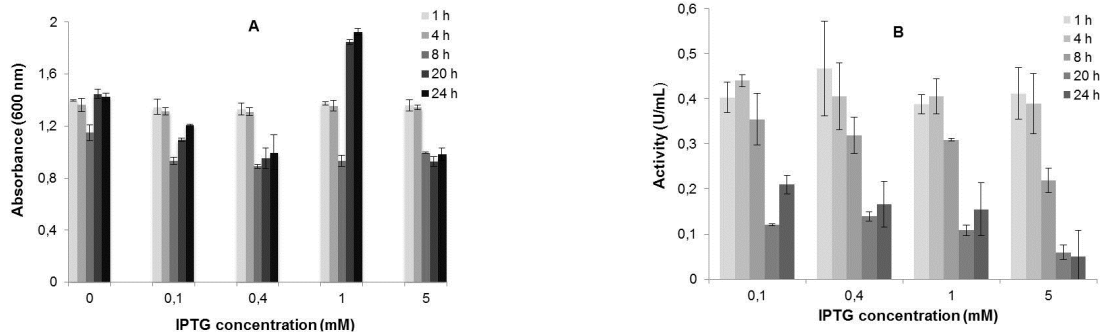
##### A. Efectul concentrației de IPTG, a duratei și temperaturii de inducție

Toate experimentele au fost realizate în duplicat iar pentru analiza rezultatelor au fost utilizate valorile medii obținute.

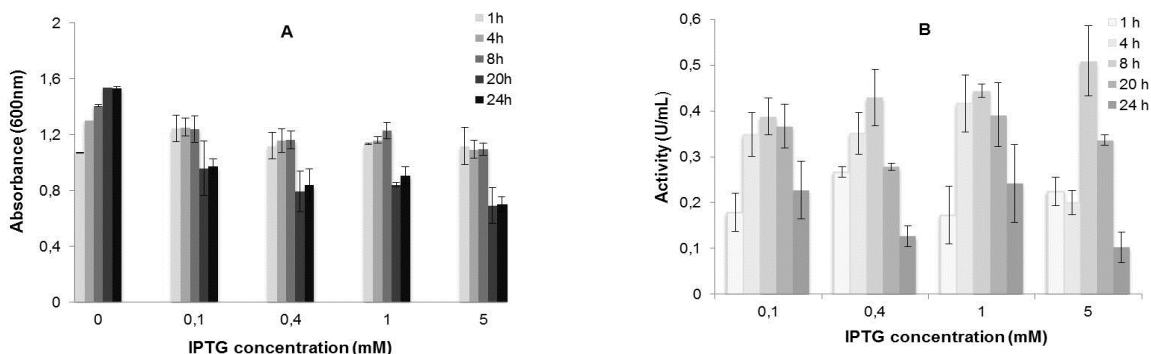
După ce culturile au atins densitatea optică 0.6 s-au adăugat diferite volume soluție stoc de IPTG 100 mM, astfel încât s-au obținut concentrații de 0.1 mM, 0.4 mM, 1 mM și 5 mM. În timpul creșterii la 37 și 30°C a fost monitorizată activitatea hidrolazică. Astfel, la intervale bine determinate de timp (înainte de inducție și după 1, 4, 8, 20 și 24 ore) s-au prelevat câte 1 mL din fiecare cultură și s-a determinat OD și activitatea. O altă probă de 1 mL a fost centrifugată și apoi utilizată pentru analiză prin SDS-PAGE.

Se observă (Fig. 21A) că în culturile induse la 30°C apare deja după 8 ore de la inducție o scădere semnificativă a viabilității celulelor, asociată cu acumularea produsului exprimat. În același timp și în concordanță cu aceasta, cea mai înaltă activitate enzimatică se manifestă în general după 4 ore de la inducție (Fig. 21B).





**Fig. 21.** Cresterea celulara (A) si activitatea enzimatica (B) dupa inductie cu IPTG in diferite concentratii la 30°C



**Fig. 22.** Cresterea celulara (A) si activitatea enzimatica (B) dupa inductie cu IPTG in diferite concentratii la 37°C

In cazul inducției realizate la 37°C IPTG inhiba creșterea celulară indiferent de concentrație (Fig. 22A). Efectele toxice sunt vizibile deja după 4 ore de la inducție. Aceeași scădere bruscă a viabilității a fost observată și în acest caz după 20 ore, cauzată probabil de exprimarea altor proteine, unele cunoscute pentru efectul negativ pe care îl au asupra creșterii celulare.

Această diferență de timp (8 ore la 30°C, comparativ cu 20 ore la 37°C) poate fi determinată de viteza redusă de replicare la 30°C, când celulele sunt mai vulnerabile la efectele toxice combinate ale IPTG și ale proteinelor heteroloage. La 37°C, maximum de activitate se înregistrează după 8 ore de la inducție indiferent de concentrația IPTG, activitate maximă fiind înregistrată la concentrația maximă a IPTG (5 mM), în ciuda numărului redus de celule viabile (Fig. 21B).

În ultima etapă a inducției se observă la ambele temperaturi o tendință de reluare a creșterii. Fenomenul, descris deja în literatură poate fi explicat prin faptul că anumite celule își pierd capacitatea de a produce proteina și prin această efectul inhibitor datorat plasmidei inserate este limitat, iar creșterea poate fi reluată<sup>12</sup>.

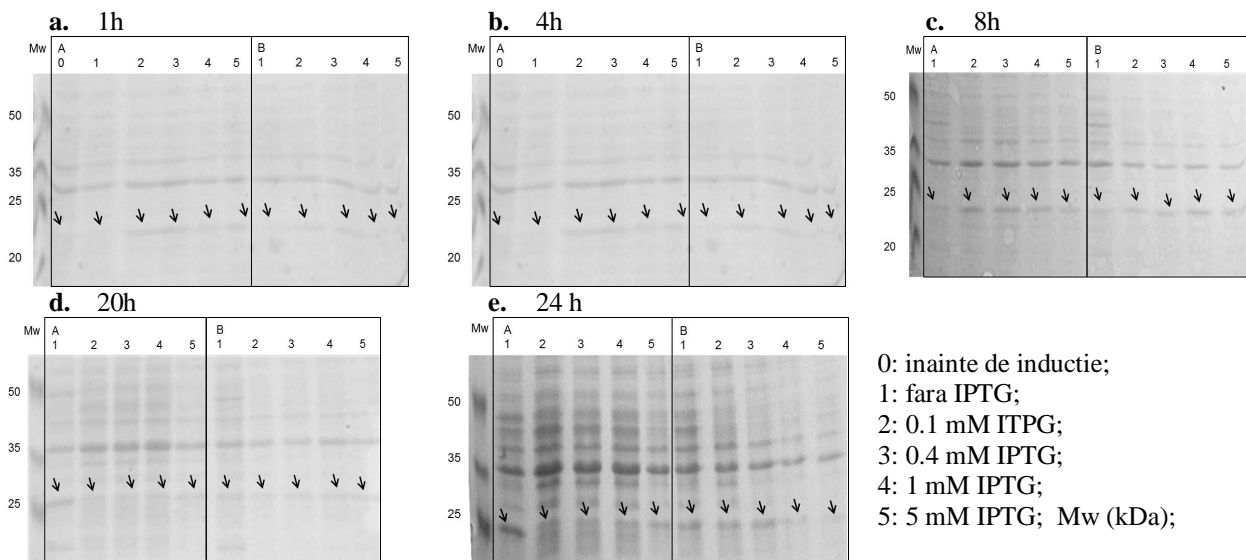
Rezultatele obținute la ambele temperaturi (Fig. 21-22) arată că IPTG poate fi folosit cu succes ca inductor pe un domeniu larg de concentrații. În timp ce pentru lipazele și esterazele din diferite specii de *Bacillus* și *Geobacillus* literatura prezintă ca optime concentrații de la 0.1 mM la 0.5 mM<sup>13</sup> și 1 mM<sup>14</sup>, pentru carboxiesterazele din *Anoxybacillus sp.* a fost determinată ca optimă o concentrație de 1 mM IPTG<sup>15</sup>.

Datele obținute la analiza SDS-PAGE sunt în concordanță cu cele deja relatate. Astfel în cazul inducției la 30°C (Fig. 23a-dA), banda Est/Lip 25 kDa este vizibilă în primele 4 ore și poate fi observată chiar și la 8 ore. După aceea apar alte proteine, în timp ce banda urmărită dispăre. În absența inducției, banda caracteristică proteinei utile apare abia după 20 ore.

Pentru culturile induse la 37°C, cea mai intensă bandă specifică proteinei induse apare, așa cum ne așteptăm, după 4 și 8 ore (Fig. 23a-d, B). Probele prelevate înainte sau după prezintă o bandă estompată caracteristică Est/Lip.

Atât temperatura cât și durata influențează exprimarea proteinei și este necesară determinarea combinației optime. Deși celulele de *E. coli* se dezvoltă optim la 37°C, o producție sporită de protein exprimate necesită uneori temperaturi mai scăzute. Astfel o viteză de creștere redusă poate favoriza exprimarea și în același timp limitează formarea agregatelor proteice în citosol<sup>16</sup>.

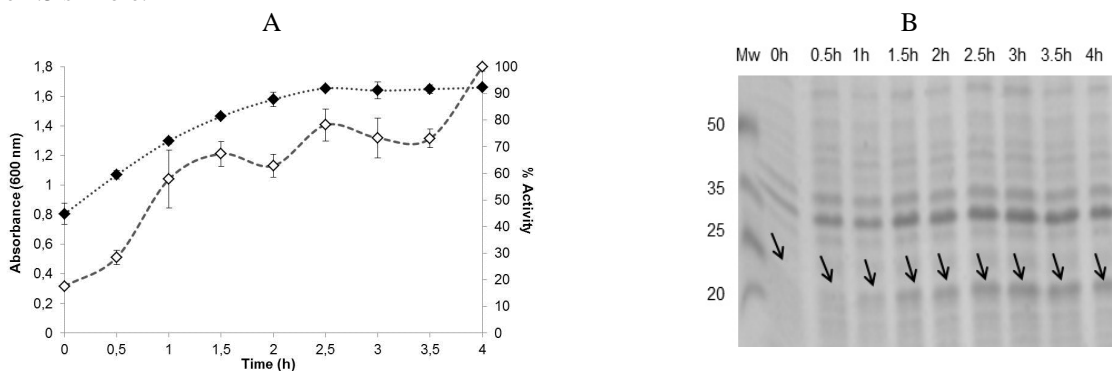
În scopul obținerii de informații suplimentare referitoare la exprimarea proteinei în prima oră după inducție, s-a realizat un experiment paralel la 30°C, la o concentrație a IPTG de 0.1 mM. La fiecare 30 minute, timp de 4 ore, au fost prelevate câte 500 μL suspensie celulară care a fost utilizată atât pentru determinarea activității hidrolazice, cât și pentru analiza SDS-PAGE.



**Fig. 23.** Expimarea Est/Lip la 30°C (A) si la 37°C (B), dupa 1, 4, 16, 20 si 24 h de la inductie.

Se observa (Fig. 24A) ca in timp ce cresterea stagneaza dupa 2.5 ore, activitatea hidrolazica datorata proteinei Est/Lip produsa creste continuu pana la finalul perioadei monitorizate.

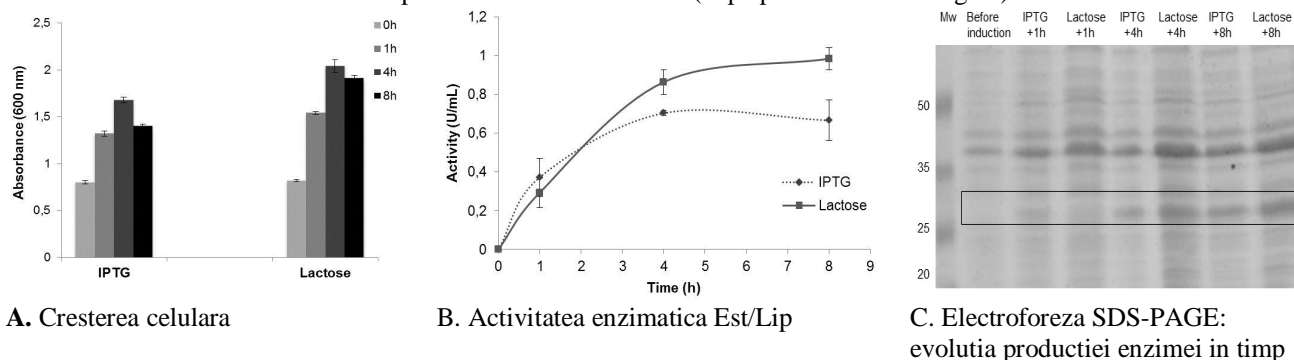
Forma curbei care reprezinta activitatea sugereaza ca exprimarea proteinei tinta nu este liniara, ci mai degraba oscilatorie. Cu toate acestea, analiza electroforetica nu a evidentiat modificari esentiale ale intensitatii benzii caracteristice intre 2.5 si 4 ore.



**Fig. 24.** A. Cresterea celulara (♦) si activitatea (◇) in in primele 4 ore dupa inductia cu IPTG; B. Analiza prin electroforeza SDS-PAGE a amestecului in primele 4 ore dupa inductia cu IPTG

### B. Inductia cu IPTG si lactoza

Au fost realizate in mod similar culturi paralele in prezenta IPTG (0.1 mM concentratie finala) si respectiv lactozei (10 mM concentratie finala deoarece este un substrat pentru *E. coli*). Au fost prelevate cate 1 mL suspensie dupa 4 si 8 ore pentru determinarea activitati hidrolazice si pentru analiza SDS-PAGE (dupa prealabila centrifugare).



**Fig. 25.** Rezultatele obtinute dupa inductia cu IPTG 0.1 mM sau lactoza 10 mM

Asa cum era e asteptat, in prezenta lactozei (10 mM) cresterea celulara a fost mai eficienta lactose, comparative cu 0.1 mM IPTG (Fig. 25A). Mai mult decat atat, atat activitatea enzimatica (Fig. 25B) cat si gradul de exprimare evidentiat prin electroforeza (Fig. 25C) au fost superioare la inductia cu lactoza. Cele mai bune rezultate s-au obtinut la 8 ore de la inductia cu lactoza.

Cateva observatii se impun pe baza rezultatelor obtinute. Desi IPTG se utilizeaza in general pentru inducerea exprimarii unor protein recombinante, acesta nu poate fi metabolizat de celule si indeplineste un rol pur functional, in acelasi timp determina si o oarecare toxicitate indusa celulelor<sup>17</sup>. Lactoza in schimb intra in metabolismul celulei de *E. coli*, astfel disponibilitatea ei de regulator al operonului *lac* scade<sup>18</sup> si astfel este greu de determinat o concentratie optima a lactozei la utilizarea sa ca inductor. Literatura prezinta valori diferite, de la 11 mM<sup>19</sup> pana la 146 mM sau chiar 292 mM<sup>20</sup>. Este de aceea posibil ca la concentratie mai mare ale lactozei se vor obtine randamente mai mari. Vor fi efectuate studii si in etapa urmatoare.

### C. Studiul destabilizării membranare

In scopul eliberării enzimei in spatiul periplasmatic a fost utilizat protocolul NOVAGEN standard (NOVAGEN, 2003), care foloseste un tampon liza prin soc osmotic un tampon ce contine Tris 30 mM/zaharoza 20% (pH 8), EDTA 1 mM si MgSO<sub>4</sub> 5 mM.

Au fost testate si alte metode de destabilizare a membranelor celulare. In acest scop celulele izolate din 50 mL din culturile paralele obtinute ca mai sus au fost resuspendate in 20 ml tampon Tris 50 mM, pH 8. In probe s-a adaugat fie dimetilsulfoxid (DMSO) fie cloroform pana la o concentratie finala de 1% iar amestecurile au fost agitate magnetic la temperatura camerei timp de 20 min (Fig. 26).

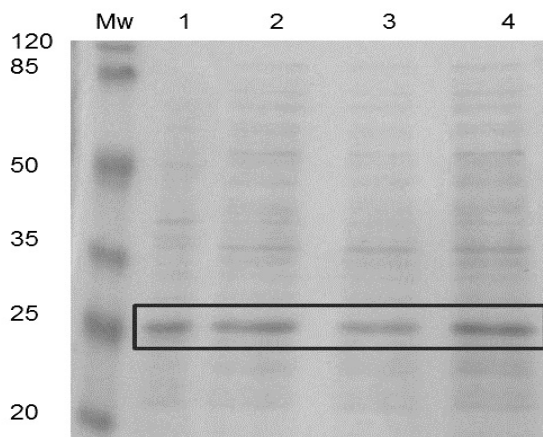
O proba similar obtinuta a fost de 5 ori congelata respectiv dezghetata. Dupa fiecare ciclu probele au fost centrifugate la 20 min la 8000 rpm iar supernatantul s-a introdus la dializa in tampon Tris (50 mM, pH 8) peste noapte. Dupa o concentrare de 5 ori, din cate 20 µl solutie obtinuta s-a determinat activitatea hidrolazica, respectiv s-a efectuat o analiza SDS-PAGE. Si aceste experimente au fost efectuate in duplicat.

Cea mai mare activitate a Est/Lip exprimata in fractia periplasmica s-a obtinut la destabilizarea membranara prin congelare-dezghetare repetata, urmata indeaproape de socul osmotic cu tamponul recomandat standard, in timp ce utilizarea DMSO si a cloroformului a dus la un grad de recuperare mai redus dar totusi satisfacator (Tabelul 7).

**Tabelul 7.** Recuperarea activitatii Est/Lip din fractia periplasmatica dupa utilizarea unor metode de destabilizare membranara a celulelor

Metoda	Concentratia	Activitatea (U/mL) ± st.dev
Soc osmotic (EDTA/MgSO <sub>4</sub> )	1 mM/5 mM	1.36 ± 0.26
DMSO	1%	1.19 ± 0.01
Cloroform	1%	1.00 ± 0.12
Congelare-Dezghetare (5 cicluri)	-	1.47 ± 0.06

Tratamentul optim s-a demonstrat a fi repetarea congelarii-decongelarii care in plus este usor de realizat, nu exista riscul interferentei cu alte protein proprii si nu necesita etape ulterioare de dializa sau pregatiri ulterioare ale probelor. In fine, dar nu in ultimul rand, utilizarea acestui tratament protejeaza enzima de efectul pe care sarurile sau solventii il pot avea asupra ei.



**Fig. 26.** Electroforeza fractiilor periplasmice cu hidrolaza Est/Lip dupa aplicarea unor tratamente de destabilizare membranara: 1: soc osmotic (Tris 50 mM, sucrose 20%, pH 8)/EDTA 1 mM/MgSO<sub>4</sub> 5 mM; 2: 1% DMSO; 3: 1% cloroform; 4: 5 cicluri de congelare-dezghetare

## Concluzii

A fost obtinut un randament mare pentru exprimarea enzimei tinta in celule de *E. coli* la 37°C, dupa 8 ore in cazul utilizarii IPTG (5 mM) ca inductor. Rezultate similare s-au obtinut la 30°C si IPTG (0.4 mM) dupa o singura ora. Aceasta este pana la momentul actual varianta optima.

Testarea lactozei (10 mM) ca inductor a demonstrat inalta eficienta a acesteia. Pe langa faptul ca este ieftina si netoxica, eficienta mare ca inductor demonstrata prin studiile preliminare efectuate impun continuarea experimentelor pentru determinarea concentratiei optime.

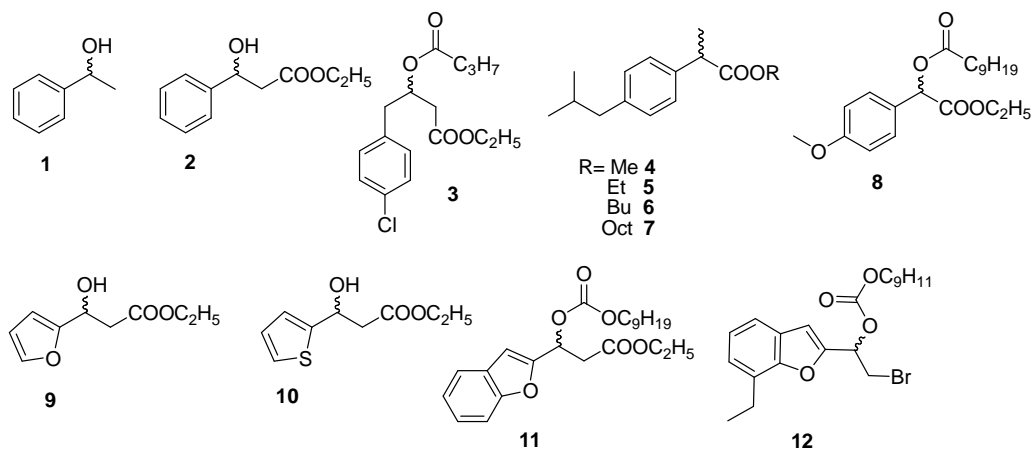
In ceea ce priveste izolarea unei enzime active, ca metoda de destabilizare membranara poate fi folosit atat socul osmotic cu un tampon ce contine zaharoza si EDTA/MgSO<sub>4</sub> cat si metoda congelarii/decongelarii repetata de 5 ori. Solventii organici, eficienti pentru permeabilizarea membranara, au un efect inhibitor asupra enzimei.

## 5. APLICATII ALE ENZIMEI RECOMBINATE DIN *A. FLAVITHERMUS* T1 IN BIOTRANSFORMARI

Desi genul studiat de noi, *Anoxybacillus*, a fost descris doar recent, au fost deja izolate cateva enzime si potentialul lor biosintetic a fost semnalat in literatura.

Ibrahim si Ahmed au purificat o celulaza din *Anoxybacillus flavithermus*<sup>21</sup> in timp ce alti cercetatori au comunicat izolarea unei depolimeraze care actioneaza asupra polihidroxicarbohidratilor din *A. gonensis* G2<sup>22</sup>. Recent a fost semnalata<sup>23</sup> si o lipaza termostabila izolata din *A. kamchatkensis* care pastreaza 50% din activitatea sa dupa incalzire timp de 30 minute la 80°C. In biotransformari au fost deja utilizate o carboxiesteraza partial purificata izolata din *A. gonensis* A4<sup>24</sup> si o hidrolaza combinata Est/Lip din *Anoxybacillus* sp.

Primele teste catalitice asupra enzimei recombinata izolata au avut ca si obiectiv procese de rezolutie cinetica ale catorva compusi organici cu importanta practice: feniletanolul **1**, compus antiseptic si antimicrobian utilizat si in parfumerie;  $\alpha$  si  $\beta$ -hidroxi acizii si esterii lor **2,3,8-12**, utilizati ca precursori pentru sinteza unor medicamente cum ar fi taxolul, un medicament citostatic, flupxetinul, medicament antidepresiv, pravastatinul si atorvastatinul, doi agenti cu activitate anticolesterolica moderni, sau ibuprofenul **4-7**, medicament antiinflamator cu structura nesteroidica intens utilizat la ora actuala (Fig. 27).



**Fig. 27.** Substraturi utilizate la testarea potentialului biocatalitic al enzimei recombinata purificata

Reactiile au fost realizate pana acum doar la scara analitica. Amestecul de reactie, alcatuit din 2.5 mg substrat, 500  $\mu$ L solutie de enzima (~100  $\mu$ g/mL enzima in tampon Tris 50 mM, pH 8) a fost pastrat peste noapte la 45°C, sub agitare la 200 rpm. In final au fost prelevate cate 10  $\mu$ L proba, fiecare proba a fost diluata la 500  $\mu$ L cu amestec hexan: izopropanol (5:1, v:v), su dupa uscare-filtrare a fost analizata prin cromatografie chirala pe coloanele HPLC adecvate in conditiile din tabelul 8. A fost utilizat un sistem cromatografic Agilent 1200 prevazut cu detector DAD.

Enzima testata a prezentat activitate hidrolitica doar in cateva cazuri (Tabelul 9). S-a constatat in cateva cazuri (**1**, **3**, **11**) (*S*)-enantioselectivitatea acestei enzime ( $ee < 30$ ). Substraturile **4-8** si **12** nu au fost hidrolizate in conditiile utilizate si necesita studii suplimentare.

**Tabelul 8.** Condițiile separării cromatografice chirale cu HPLC ale compusilor testați

Substrat	Nume	Coloana	Eluent <i>n</i> -hexane:IPA
(1)	Acetat de 1-feniletil	IC <sup>a</sup> OJ-H <sup>b</sup>	98:2 95:5
(2)	3-hidroxi-3-fenil propanoat de etil	IA/IB (tandem)	95:5
(3)	3-butoxi-4-(4-clorofenil)butanoat de etil	IA	96:4
(4)-(7)	2-(4-izobutilfenil)propanoat de (4) metil; (5) etil; (6) <i>n</i> -butil; (7) <i>n</i> -octil	IB <sup>a</sup> IB-reverse phase <sup>b</sup>	100:0 <sup>a</sup> 99:0.9 (:0.1 acid acetic) <sup>b</sup>
(8)	(etoxicarbonil)(4-metoxifenil) decanoat de metil	IA/AS-H (tandem)	96:4
(9)	3-(furan-2-il)-3-hidroxypropanoat de etil	IA	95:5
(10)	3-hidroxi-3-(tiofen-2-il)propanoat de etil	IB	90:10
(11)	decanoat de 1-(benzofuran-3-il)-3-etox-3-oxopropil	IC <sup>a</sup> IA <sup>b</sup>	90:10 90:10
(12)	2-(2-bromo-1-(undeciloxi)etil)-7-etil-benzofuran	Welk	99:1

<sup>a</sup> pentru substrat; <sup>b</sup> pentru produși

**Tabelul 9.** Enantioselectivitatea proceselor de hidroliza enzimatică studiate

Substrat	<i>ee<sub>s</sub></i> (%)	<i>ee<sub>p</sub></i> (%)	<i>c</i> (%)	<i>E</i>	Configurația*
1	40.9	99.9	29.03	>200	( <i>S</i> )
3	4.87	99.9	4.65	>200	( <i>S</i> )
11	14.9	99.9	13.10	>200	( <i>S</i> )

\* configurația enantiomerului mai reactiv determinată pe baza datelor din literatură

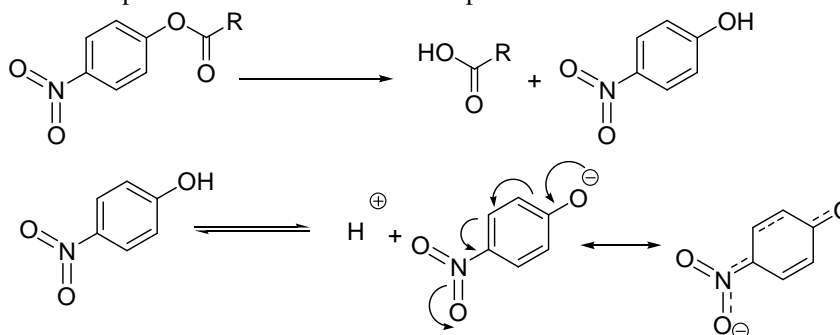
## Obiectiv 2. Determinarea activității enzimatică

### Profilul de pH al enzimei recombinată termoactivă cu activitate lipazică/esterazică

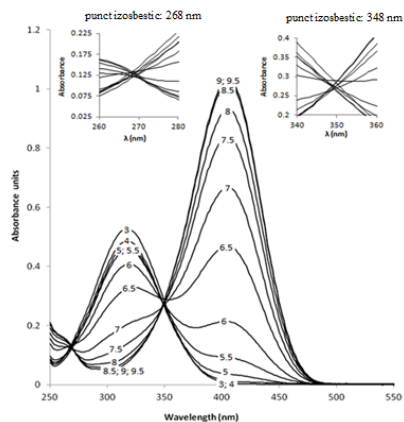
**Obiectiv:** identificarea corectă a domeniului de pH al unei enzime prezintă atât importanță teoretică cât și aplicativă. Hidroliza esterilor *p*-nitrofenolului pentru determinarea spectrofotometrică a activității enzimatică a lipazelor și esterazelor este limitată la domeniul bazic, care nu este optim pentru toate enzimele. După demonstrarea unor asemenea situații am propus strategii care să permită utilizarea metodei și în domeniul acid.

Una din cele mai utilizate metode de determinare a activității lipolitice *in vitro* are la bază monitorizarea spectrofotometrică a *p*-nitrofenolului (la 405-410 nm) eliberat la hidroliza esterilor (Fig. 28), comercial disponibili la prețuri accesibile sau ușor de sintetizat.

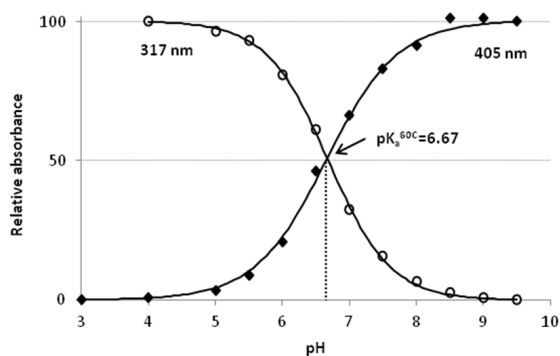
Metoda prezintă totuși anumite limitări și este strict dependentă de pH deoarece *p*-nitrofenolul poate disocia eliberând un proton și anionul *p*-nitrofenoxidic (*p*-nitrofenolat)<sup>-</sup>, stabilizat prin conjugare. A fost efectuat din acest motiv un studiu sistematic al metodei alese pentru determinarea activității lipolitice.<sup>25</sup>

**Fig. 28.** Hidroliza esterilor și ionizarea *p*-NP

Astfel, în domeniul acid este prezentă specia incoloră, *p*-nitrofenolul, cu maxim de absorbție la 317 nm, în timp ce odată cu trecerea spre domeniul neutru al pH-ului echilibrul se deplasează spre formarea fenolatului, soluția se colorează spre galben, maximul de absorbție de la 317 nm dispare și este înlocuit de un maxim de absorbție la 405-410 nm. Chiar și acest maxim de absorbție se comportă în așa fel: astfel, la pH= 7 absorbanta este de 3 ori mai mare decât la pH= 6.



**Fig. 29.** Spectrul UV-VIS al amestecului *p*-nitrofenol/*p*-nitrofenolate la diferite pH-uri (in solutie 0.05 mM, la 60°C, cu spectrofotometru Cary® 50 UV-Vis -Varian Inc., Australia, cu celule termostatate).



**Fig. 30.** Curba de titrare a *p*-NP la 317 nm si 410 nm; cele doua puncte de inflexiune apar la  $6.68 \pm 0.01$  si  $6.65 \pm 0.03$ , ceea ce permite determinarea aciditatii la 60°C:  $pK_a^{60^\circ C}$  of  $6.67 \pm 0.03$ .

S-au determinat cele doua puncte izosbestice, la care valoarea absorbantei nu depinde de pH, la 268 si respectiv 348 nm. In figura 29 se observa ca aceste caracteristici sunt pastrate si la 60°C, temperatura optima a multor lipaze termostabile.

S-a demonstrat astfel ca determinarea simpla a absorbantei *p*-nitrofenolului la 405-410 nm nu poate fi utilizata fara a se avea in vedere si valoarea pH-ului.

Fojan<sup>26</sup> si Bornscheuer<sup>27</sup> au demonstrat deja ca esterazele prezinta un potential negativ la anumite valori ale pH-ului, dependent de pH-ul optim, situate de obicei in jur de 6. In tabel 10 sunt prezentate doar cateva exemple in acest sens din literatura de specialitate.

**Tabel 10.** Exemple de esteraze cu profil cunoscut al pH-ului prezentate in literatură (activitatea enzimatica determinate prin metoda studiata)

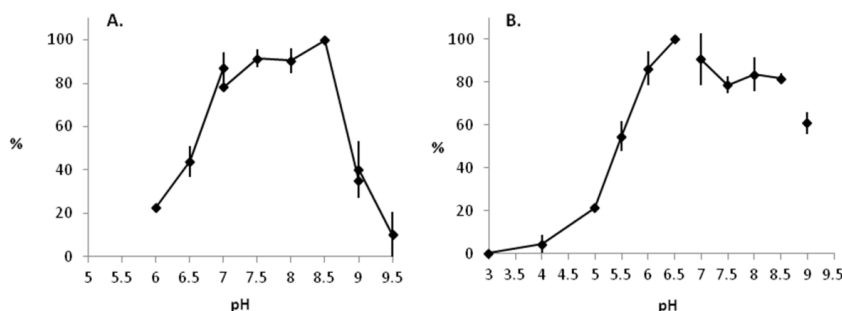
Enzima	Sursa	$\lambda$ [nm]	$\epsilon$	pH (domeniu) optim	Ref.
Esteraza termostabila	<i>G. thermoleovorans</i>	410	-	9.5 (7.5-9.5)	28
Esteraza termostabila	<i>Geobacillus</i> sp.	400	-	9.5; 10 (7-12)	29
Esteraza termostabila, fam. VII		405	-	9 (7-10)	30
Esteraza termostabila	<i>B. kaustophilus</i>	405	$16,980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	8	31
Esteraza termostabila	<i>A. gonensis</i>	405	-	5.5, 7.5	32
Esteraza termostabila	<i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1	420	$0.016 \mu\text{M}^{-1}$	8.5 (7.5-9.5)	33
Esteraza psihofila	<i>Salinisphaera</i> sp. P7-4	410	-	8-9 (7.5-10)	34
Esteraza psihofila	<i>Acinetobacter venetianus</i> V28	405	-	9 (8-10)	35

A fost studiata enzima recombinata cu activitate carboxiesterazica (Est/Lip) izolata din *Anoxybacillus flavithermus* T1. Profilul de activitate a fost determinat cu acetat de *p*-nitrofenil (*p*NPA).

Amestecul de reactie: 900  $\mu\text{L}$  tampon, 90  $\mu\text{L}$  enzima si 10  $\mu\text{L}$  solutie stoc 5 mM *p*NPA in izopropanol. Dupa preincubarea enzimei cu tampon timp de 3 minute la temperatura dorita se adauga Solutia preincalzita a substratului si se determina viteza initiala (timp de 0.3 min) ca fiind  $\Delta A/\text{min}$ . S-a utilizat un spectrofotometru Cary® 50 UV-Vis (Varian Inc., Australia) cu celulele termostatate. Au fost efectuate determinari la 410 nm si la 348 nm, fata de Solutia de enzima ca si blanc. Concentratiile *p*NP s-au determinat dintr-o curba de calibrare trasat in prealabil.

Toate experimentele asau efectuat in duplicat. S-a definit unitatea de activitate ca acea cantitate de enzima care elibereaza in conditiile date intr-un minut 1  $\mu\text{mol}$  *p*NP.

Cand monitorizarea *p*NP s-a realizat la 410 nm, cea mai activa s-a dovedit proba efectuata in domeniul slab bazic, cu un maxim la pH 8.5. Rezultatul este greu de acceptat si surprinzator pentru o carboziesteraza microbiana termostabila (pentru comparatie vezi datele din Tabelul 10). Monitorizand insa reactia la 348 nm se obtine un alt profil al pH-ului, cu activitate maxima la pH 6.5 Fig. 31B). Acest rezultat este in concordanta cu studiile anterioare<sup>26-27</sup> si cu prezenta unui rest de histidina (cu un  $\text{pK}_a \sim 6.5$ ) in situsul catalitic<sup>36</sup>.



**Fig. 31.** Profilul de pH (variatia activitatii enzimatice relative cu pH-ul) al enzimei recombinante (Est/Lip) din *A. flavithermus* determinat prin metoda cu *p*-NP. **A:** monitorizare la 410 nm; **B:** monitorizare la 348 nm.

Diferentele care apar sunt datorate faptului ca speciile monitorizate sunt diferite: astfel la 410 nm este monitorizat doar *p*-nitrofenolatul, in timp ce maximul de la 348 nm reprezinta chiar punctul izosbestic, care nu depinde de pH.

Pentru eliminarea acestor liminari exista mai multe posibilitati.

1. Monitorizarea reactiei de eliberare a *p*-NP la punctele izosbestice<sup>37</sup>, cum s-a aratat deja; se impune totusi evitarea absorbtiei la 268 nm, apropiata de 280 nm caracteristica tuturor proteinelor, astfel incat singura posibilitate ramane punctul de la 348 nm, unde enzima testate absoarbe linear in domeniul 0-100  $\mu\text{M}$ .
2. Determinarea prealabila a coeficientului de extinctie molară al *p*-NP la 405-410 nm la fiecare valoare a pH-ului si utilizarea ecuatiei Lambert-Beer pentru determinarea concentratiei.<sup>38</sup> O abordare similara se poate utiliza si pentru domeniul cid, cand  $\text{pH} < 6.5$  si se poate monitoriza forma acida a *p*-NP care absoarbe la 317 nm.

$$c = A \cdot \varepsilon^{-1} \cdot l^{-1}$$

3. Alti cercetatori au sugerat<sup>39</sup> utilizarea pH-ului optim al reactiei, care se situeaza in domeniul acid. Astfel s-a sugerat<sup>40</sup> conducerea analizei in solutie HCl 3N, urmata de corectarea pH-ului la 8.5 si monitorizarea absorbantei la 410 nm. Aceasta abordare este inasa limitata datorita volumelor mici la care se realizeaza determinarile de activitate, care fac dificila utilizarea unui electrod de pH si in plus apare riscul hidrolizei chimice si interferente greu de controlat.

In concluzie, daca activitatea hidrolazelor (lipase, esterase, fosfataze, glicozidaze, etc) care scindeaza esterii *p*-NP trebuie efectuata la diferite valori ale pH-ului, trebuie sa avem in vedere faptul ca monitorizarea *p*-NP la 410 nm poate aduce erori si trebuie abordata una din cele 3 metodologii prezentate mai sus. In plus, la investigarea unei enzime termostabile, determinarea trebuie efectuata la temperatura ridicata, care afecteaza si reactia de disociere a *p*-NP, astfel incat este obligatorie trasarea unor curbe de calibrare la temperature utilizata. In acest caz solutia de enzima poate fi preincubata la temperatura de lucru, cand hidroliza chimica are loc cu viteza superioara, de aceea e necesar un studiu prealabil al acestui process in absenta enzimei, la temperatura de interes.

In fine, trebuie avuta in vedere si stabilitatea la temperatura a solutiilor tampon utilizate la determinarea activitatii unor enzime termostabile, cunoscuta fiind instabilitatea unor solutii tampon.<sup>41</sup>

## CONCLUZII

Tulpina de *Anoxybacillus flavithermus* izolată reprezintă o sursă locală de enzime hidrolitice termostabile, care prezintă o bună activitate esterolitică/lipolitică. Extractul enzimatic brut (precipitatul cu acetona) 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. La purificarea enzimei native au fost întâmpinate 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 in colaborare cu colectivul prof. Vertesi de 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 success 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 clorofom au interferat cu activitatea enzimatică chiar dacă recuperarea Est/Lip a fost comparabilă cu cea prin celelalte două metode amintite.

Studiile preliminare privesc posibilitatea utilizării enzimei recombinante în procese biocatalitice a condus la rezultate care indică o selectivitate crescută la temperaturi moderate (45-50°C), inclusiv fata de substraturile voluminoase.

*Determinarea activității enzimaticice:* S-au preparat solutii stoc de substrat (acetat de *p*-nitrofenol (*p*NPA) in izopropanol) de concentratie 5 mM.

Pentru monitorizarea *p*-nitrofenolului (*p*NP) eliberat sub actiunea solutiei de enzima (la 410 nm) s-a folosit un spectrofotometru UV-VIS Cary® 50 (Varian Inc., Australia) cu celule termostatate. A fost determinata activitatea enzimatica la 60°C, in tampon pH 8.0, Tris-HCl 50 mM astfel:

Amestecul de reactie care contine 900  $\mu$ L tampon si 90  $\mu$ L proba biologica testate s-a termostatat 5 min la temperatura dorita. Adaugarea solutiei preincalzite a substratului (10  $\mu$ L) a fost considerat momentul 0 al detrimnarii. Viteza initiala (primele 0.3 minute) a fost utilizata pentru determinarea variatiei absorbantei probei la 410 nm in unitatea de timp (min).

Au fost realizate teste enzimaticice paralele si pentru culturile lipsite de inductie, care au fost considerate probe martor in toate celalte cazuri, activitatea hidrolazica a acestora fiind ulterior scazuta in toate cazurile, fiind astfel normalizata activitatea datorata prezentei mediului de cultura si a enzimei produsa in absenta inductorului.

O unitate de activitate a fost defninite ca acea cantitate de enzima care elibereaza in conditiile date 1  $\mu$ mol *p*NP intr-un minut.

*Analiza SDS-PAGE:* Electroforeza SDS-PAGE a fost realizata intr-un sistem discontinuu vertical pe minigel (Scie-Plas TV100 YK, Marea Britanie); vizualizarea s-a efectuat cu Coomassie Brilliant Blue R-250.

## ***CONCLUZII GENERALE***

Obiectivele acestei etape au fost atinse in totalitate.

1. A fost identificata o sursa noua de enzime termofile.
2. Din sursa izolata a fost izolata in stare partial purificata o hidrolaza cu activitate esterazica/lipazica, care a fost caracterizata.
3. In vederea purificarii avansate, enzima a fost clonata, exprimata in *E. coli* si apoi purificata prin metodele cunoscute. Exprimarea enzimei recombinante a fost optimizata. La unele din protocoalele de purificare au fost efectuate studii amanuntite, care au permis imbunatatirea randamentelor de izolare a produsului urmarit.
4. Enzima recombinata a fost caracterizata si testate in procese de rezolutie enzimatica cinetica pe clase de compusi cu importanta farmaceutica.



## INDICATORI DE REZULTAT

### I. Indicatori generali

- a. o enzima recombinata termofila
- b. un protocol de clonare/exprimare/producere a enzimei termofile recombinat
- c. studii de optimizare a procesului de exprimare
- d. protocol de purificare partiala a enzimei
- e. 2 articole stiintifice publicate/acceptate spre publicare in reviste cotate ISI (factor de impact cumulat: 2.737; RIS cumulat: 1.40196):
  - i. Chiş, L.M., Hriscu, M., Chirilă, F., Lupan, I., Toşa, M., Irimie, F.D. (2012) Recombinant *Anoxybacillus flavithermus* t1 esterase/lipase: optimization of expression and recovery, *Environ. Eng. Manag. J.*, **1(11)**, 1915-1922 (factor de impact 1.004).
  - ii. Hriscu, M., Chiş, L., Toşa, M., Irimie, F.D., pH-Profiling of thermoactive lipases and esterases: caveats and further notes, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* acceptat spre publicare, **2012** (factor de impact 1.733; scor relativ de influenta 1.40196).
- f. Numărul mediu de poziții echivalente cu normă întreagă pe proiect **3**, din care:
  1. Cercetatori cu experienta **1.7**
  2. Postdoctorat: **0.05** (Miclean Mirela, Levei Erika)
  3. Doctoranzi: **0.15** (Naghi Mara)
  4. Studenti master: **0.5** (Moisa Madalina, Dima Norbert)
  5. Tehnicienii **0.6** (Varga Ibolya, Bodea Ioan)
- g. Valoarea investițiilor în echipamente pentru proiecte: **299.519,22 lei**
- h. Număr rețele de cercetare susținute: **1** (Centrul de cercetare: *Biotransformarea substraturilor organice* din cadrul Facultatii de chimie si inginerie chimica, Universitatea Babes-bolyai Cluj Napoca)

### II. Indicatori specifici (DC6 Biotehnologii)

1. Au fost puse bazele obtinerii unor biocatalizatori selectivi pentru producerea eficienta de medicamente.
2. Pe baza rezultatelor obtinute in aceasta etapa vor fi elaborate in etapele viitoare tehnologii competitive in sinteza de medicamente si produse (enzime, intermediari si medicamente) care vor putea fi comercializate ca produse finite in conditii de competitivitate economica.

Director proiect,  
Conf. Dr. Ing. Monica Iana TOȘA

## LITERATURA

1. Arpigny, J. L., Jaeger K. E. Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties *Biochem. J.* **1999**, *343*, 177-183.
2. 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
3. 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.
4. Nawani, N., Khurana, J., Kaur, J. A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus sp.*: purification and characterization, *Mol. Cell. Biochem.* **2006**, *290*, 17-22
5. 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*.
6. 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 stearothermophilus* carboxylesterase Est30, *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 551-561; 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.
7. Chiş, L.M., Hriscu, M., Chirilă, F., Lupan, I., Toşa, M., Irimie, F.D. (2012) Recombinant *Anoxybacillus flavithermus* T1 esterase/lipase: optimization of expression and recovery, *Environ. Eng. Manag. J.*, **1(11)**, 1915-1922.
8. Khow O., Suntrarachun S., (2012), Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 159-162.
9. Pramesti H.T., Suciati T., Indrayati A., Asjarie S., Retnoningrum D.S., (2012), Recombinant human bone morphogenetic protein-2: optimization of overproduction, solubilization, renaturation and its characterization, *Biotechnology*, **11**, 133-143; Simpson R.J., (2010), Solubilization of *Escherichia coli* recombinant proteins from inclusion bodies, *Cold Spring Harbor Protocols*, **9**, doi: 10.1101/pdb.prot5485; Ventura S., (2005), Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility, *Microbial Cell Factories*, **4**, 11-19.
10. Hannig G., Makrides S.C., (1998), Strategies for optimizing heterologous expression in *Escherichia coli*, *Trends in Biotechnology*, **16**, 54-60
11. Ames G.F.L., Prody C., Kustu S., (1984), Simple, rapid and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform, *Journal of Bacteriology*, **163**, 1181-1183; Betterton M.D., Brenner M.P., (1999), Electrostatic edge instability of lipid membranes, *Physical Review Letters*, **82**, 1598-1601; Ha B.Y., (2001), Stabilization and destabilization of cell membranes by multivalent ions, *Physical Review E*, **64**, 051902 (5 pages).
12. Miroux B., Walker J.E., (1996), Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels, *Journal of Molecular Biology*, **260**, 289-298.
13. Montoro-García S., Martínez-Martínez I., García-Carmona F., Navarro-Fernández J., Takami H., Sánchez-Ferrer A., (2009), Characterization of a novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426 shows the existence of a new carboxylesterase family, *Journal of Bacteriology*, **19**, 3076-3085.
14. Hutchins L.M., Hunter L., Bergquist P.R., Ehya N., Hutton C.A., (2004), Highly enantioselective recombinant thermoalkalophilic lipases from *Geobacillus* and *Bacillus* sp., *Tetrahedron: Asymmetry*, **15**, 2975-2980.
15. Ay F., Karaoglu H., Inan K., Canakci S., Belduz O., (2011), Cloning, purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from *Anoxybacillus* sp. PDF1, *Protein Expression and Purification*, **80**, 74-79.
16. Luan C.H., Shihong Q., Finley J.B., Carson M., Gray R.J., Huang W., Johnson D., Tsao J., Reboul J., Vaglio P., Hill D.E., Vidal M., DeLucas L.J., Luo M., (2004), High-throughput expression of *C. Elegans* proteins, *Methods*, **14**, 2102-2110; Schein C.H., (1989), Production of soluble recombinant proteins in bacteria, *BioTechnology*, **7**, 1141-1148.
17. Ko, J. A., Hyung, J. J., Young, B. Y., Su-Jin, P., Young-Jung, W., Doman, K., Young-Min, K., Lee, W. S. Large increase in *Leuconostoc citreum* KM20 dextran-sucrase activity achieved by changing the strain/inducer combination in an *E. coli* expression system, *J. Microbiol. Biotechn.* **2012**, *22*, 510-515.
18. Parekh T., Patel G., (2012), Effect of IPTG induction on production of Fcε-BIK-A new approach for asthma and allergy in recombinant *Escherichia coli*, *Life sciences Leaflets*, **7**, 50-55; de Vos W.M., (2011), Systems solutions by lactic acid bacteria: from paradigms to practice, *Microbial Cell Factories*, **10**, Suppl 1:S2.
19. Farmer C.S., Kurtz D.M.Jr., Phillips R. S., Ai J., Sanders-Loehr J., (2000), A leucine residue "gates" solvent but not O access to the binding pocket of *Phascolopsis gouldii* hemerythrin, *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 17043-17050.
20. Yan J., Zhao S.F., Mao Y.F., Luo Y.H., (2004), Effects of lactose as an inducer on expression of *Helicobacter pylori* rUreB and rHpA, and *Escherichia coli* rLTKA63 and rLTB, *World Journal of Gastroenterology*, **10**, 1755-1758
21. 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.

22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Hriscu, M., Chiş, L., Toşa, M., Irimie, F.D., pH-Profiling of thermoactive lipases and esterases: caveats and further notes, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* acceptat spre publicare, **2012**
26. Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T., Petersen, S.B. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* **2000**, *82*, 1033-1041.
27. Bornscheuer, U.T., Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2002**, *26*, 73-81.
28. Soliman, N.A., Knoll, M., Abdel-Fattah, Y.R., Schmid, R.D., Lange, S., Molecular cloning and Characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. *Proc. Biochem.* **2007**, *42*, 1090-1100.
29. Tekedar, H.C., Shanlı-Mohamed, G., Molecular cloning, over expression and characterization of thermoalkalophilic esterases isolated from *Geobacillus* sp. *Extremophiles* **2011**, *15*, 203–211.
30. Kang, C.H., Oh, K.H., Lee, M.H., Oh, T.K., Kim, B.H., Yoon, J.H., A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomic library. *Microb. Cell Fact.* **2011**, *10*, 41-49.
31. 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.
32. 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.
33. Yu, S., Zheng, B., Zhao, X., Feng, Y., Gene cloning and characterization of a novel thermophilic esterase from *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2010**, *42*, 288–295.
34. Kim, Y.O., Park, I.S., Kim, H.K. *et al.*, A novel cold-adapted esterase from *Salinisphaera* sp. P7-4: Gene cloning, overproduction, and characterization. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *57*, 357-364.
35. Kim, Y.O., Yu, L.H., Kim, H.K., Nam, B.H., Kong, H.J., Kim, D.G., Kim, W.J., Kim, B.S., Jee, Y.J., Lee, S.J., Gene cloning and characterization of a cold-adapted esterase from *Acinetobacter venetianus* V28. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *22*(9), 1245–1252.
36. Kim, Y.J., Choi, G.S., Kim, S.B., Yoon, G.S., Kim, Y.S., Ryu, Y.W., Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expr. Purif.* **2005**, *45*, 315-323.
37. Hotta, Y., Ezaki, S., Atomi, H., Imanaka, T., Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic archaeon. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3925-3931.
38. Kademi, A., Ait-Abdelkader, N., Fakhreddine, L., Baratti, J., Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile *Bacillus circulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *54*, 173-179.
39. Gilham, D., Lehner, R., Techniques to measure lipase and esterase activity *in vitro*. *Methods* **2005**, *36*, 139-147.
40. Brault, G., Shareck, F., Hurtubise, Y., Lepine, F., Doucet, N., Isolation and Characterization of EstC, a New Cold-Active Esterase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *PLoS ONE* **2012**, *7*(3), e32041.
41. N.M. Mesbah, J.Wiegel: Cultivation and Characterization of Alkalithermophiles. In: *Methods in Microbiology*. Vol. 35 – Extremophiles. Eds. F.A. Rainey, A. Oren, Academic Press (Elsevier) **2006**, pp. 451-468; C. Mohan: *Buffers. A guide for the preparation and use of buffers in biological systems*. Calbiochem® Biochemicals, La Jolla, CA (USA) **1995**; Reijenga, J.C., Gagliardi, L.G., Kenndler, E., Temperature dependence of acidity constants, a tool to affect separation selectivity in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1155*, 42–145.