



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00652**

(22) Data de depozit: **19/10/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/04/2024 BOPI nr. **4/2024**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI
AL ACADEMIEI ROMÂNE,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR.296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **PURCĂREA CRISTINA LIGIA,
STR.IEPURAȘULUI, NR.4, CORBEANCA,
IF, RO;**

• **PĂUN VICTORIA IOANA, STR.WEINER
PALADA, NR.50B, AP.16, SAT ROȘU,
CHIAJNA, IF, RO;**
• **OJOVAN BIANCA- OANA,
CALEA GALAȚI, NR.333, BL.13, SC.3, ET.2,
AP.44, BRĂILA, BR, RO;**
• **SÂNDULESCU- TUDORACHE MĂDĂLINA
VALENTINA, STR. SANDULESTI, NR.9,
BL.Z14, ET.2, AP.16, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ION SABINA-GABRIELA,
STR.STRUNGARULUI, NR.46, CUZA VODĂ,
CL, RO**

(54) **METODĂ DE OBȚINERE A LIPAZEI BACTERIENE PSL-2
DIN TULPINA BACTERIANĂ PSYCHROBACTER SC65A3
IZOLATĂ DIN GHEAȚA DE PEȘTERĂ DIN GHEȚARUL
SCĂRIȘOARA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a lipazei bacteriene PSL-2 recombinantă din bacteria din gheața de peșteră *Psychrobacter* cu aplicații în biotehnologii drept biocatalizator activ la temperaturi scăzute. Metoda, conform invenției, constă în etapele: exprimare genică în *Escherichia coli* prin inducție la 15°C timp de 16 h, purificarea enzimei recombinante prin cromatografie de afinitate pe rășină cu eluție cu 100 mM imidazol în tampon Tri-HCl, pH 8, rezultând enzima PSL-2 recombinantă adaptată la temperaturi scăzute cu activitate esterazică și lipazică.

tografie de afinitate pe rășină cu eluție cu 100 mM imidazol în tampon Tri-HCl, pH 8, rezultând enzima PSL-2 recombinantă adaptată la temperaturi scăzute cu activitate esterazică și lipazică.

Revendicări: 3
Figuri: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



| |
|--|
| OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI |
| Cerere de brevet de invenție |
| Nr. a 2022 652 |
| Data depozit 19-10-2022 |

RO 138120 A2

24

DESCRIEREA INVENȚIEI

Titlul invenției: Metodă de obținere a lipazei bacteriene PSL-2 din tulpina bacteriană *Psychrobacter* SC65A3 izolată din gheața de peșteră din Ghețarul Scărișoara

Inventatori: Purcărea Cristina Ligia, Păun Victoria Ioana, Ojovan Bianca-Oana, Sandulescu-Tudorache Mădalina, Ion Sabina-Gabriela

Rezumat: Invenția se referă la o metodă de obținere a lipazei bacteriene PSL-2 din tulpina *Psychrobacter* SC65A3 adaptată la temperaturi scăzute. Metoda, conform invenției, constă în etapele de exprimare genică în *Escherichia coli* BL21(DE3) prin inducție la 15°C timp de 16 h și purificare a enzimei recombinante prin cromatografie de afinitate pe rășină Ni-NTA cu eluție cu 100 mM imidazol în tampon 100 mM Tri-HCl pH 8. Această enzimă prezintă activitate catalitică de esterificare la 25°C a substraturilor p-nitrofenil butirat (p-NPB), p-nitrofenil stearat (pNFS) și p-nitrofenil palmitat (pNFP), având potențial aplicativ în biotehnologii ca biocatalizator activ la temperaturi scăzute.

Invenția are utilitate în domeniul Biotehnologie în cadrul sintezelor organice ale compușilor chirali, în procesele de esterificare și transesterificare în industria alimentară, în industria detergenților, pentru producerea biodieselului și în bioremediere, datorită eficienței catalitice ridicate a reacțiilor efectuate la temperaturi scăzute cu aport energetic redus [1,2].

Ținând cont de faptul că procesele biotehnologice care utilizează catalizatori enzimatici microbieni din specii adaptate la medii reci reprezintă alternative mai ieftine, mai sustenabile și nepoluante în comparație cu catalizatorii chimici [3], această nouă lipază obținută din bacteria izolată din gheața de peșteră are potențial aplicativ în diverse industrii care folosesc reacții de derivatizare a acizilor grași la temperaturi scăzute datorată flexibilității ridicate a situsului activ al acestor tipuri de enzime [4].

În cazul tulpinii bacteriene *Psychrobacter* SC65A3 au fost identificate activități extracelulare lipazice folosind ca substrat uleiurile vegetale de floarea soarelui, de măsline și de

armurariu cu caracteristici specifice unui catalizator adaptat la condiții de temperaturi scăzute, cu parametrii cinetici favorabili reacției de acilare la 25°C [5].

Pe baza acestor observații s-a urmărit obținerea unui catalizator microbial activ la temperaturi scăzute pe baza metodei propuse de producere a enzimei PSL-2 recombinante din bacteria din gheața de peșteră *Psychrobacter* SC65A3.

Caracteristicile metodei – pornind de la metoda de purificare a enzimelor recombinante fuzionate cu o etichetă polihistidinică prin cromatografie de afinitate pe bază de rășină Ni-NTA aplicată unei esteraze fungice din *Glaciozyma antarctica* [6] și aldehyd dehidrogenază din bacteria antarctică *Flavobacterium* PL002 [7], producerea enzimei recombinante PSL-2 s-a realizat prin expresie heteroloagă și purificarea într-o singură etapă a fracției solubile prin cromatografie de afinitate.

ADN-ul plasmidial al clonei pPSL2 care conține gena mutantă a lipazei *lip2* din *Psychrobacter* sp. SC65A.3 în vectorul de expresie pHAT2 (EMBL, Germania) a fost utilizat pentru transformarea celulelor competente de *Escherichia coli* BL21(DE3). Celulele de *E. coli* transformate au fost cultivate la 37°C în mediu lichid Luria Bertani (Invitrogen, USA) care conține 100 ug/ml ampicilină (LBA) până la o densitate optică $OD_{600} = 0,6$ și utilizate pentru inducția genică.

Expresia genei *lip2* în tulpina de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Thermo Fisher Scientific, USA) a fost realizată prin inducție în prezența 0,5 mM isopropil β -d-1-tiogalactopiranozida (IPTG) la 15°C timp de 16 h. Cultura bacteriană (100 ml) obținută în mediu lichid LBA a fost centrifugată pentru colectarea biomasei la 3000 rpm timp de 4 min. și resuspendată în 2 ml tampon 100 mM Tris-HCl pH 8. În urma lizei celulare efectuate cu omogenizatorul ultrasonic Sonoplus (Bandelin, Germania) prin aplicarea a 5 serii de pulsuri de 30s cu pauză de 60s, extrasul bacterian a fost centrifugat la 9,000 x g timp de 30 min, iar fracția solubilă colectată a fost analizată prin electroforeză în gel denaturant SDS-PAGE pentru evidențierea enzimei PSL-2 exprimate.

Etapa următoare de obținere a enzimei a constat în purificarea extractelor solubile obținute prin inducție folosind cromatografia de afinitate pe coloana de Ni-NTA (Qiagen, Germania) echilibrată cu tampon 100 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl (tampon TN). După spălarea cu 10 ml tampon TN, contaminanții proteici au fost eliminați prin aplicarea a 5 fracții de 1 ml de tampon TN conținând 20 mM imidazol. Enzima PSL-2 a fost eluată cu 100 mM imidazol în tampon TN.

Fracțiile proteice rezultate în urma purificării au fost analizate prin electroforeză denaturantă SDS-PAGE (Figura 1). În vederea utilizării, fracțiile cu conținut de PSL-2 rezultate au fost aplicate pe o coloană 7 K MWC0 Zeba Spin Desalting (ThermoFisher Scientific, USA) echilibrată în tampon 100 mM Tris-HCl pH 8, pentru înlăturarea NaCl care manifestă un efect inhibitor asupra lipazei. Enzima purificată a fost păstrată la -20°C după adăugarea de glicerol în concentrație finală de 20% (v:v) în tampon 100 mM Tris-HCl pH 8 .

Caracterizarea activității esterazice și lipazice a enzimei recombinante PSL-2 purificate s-a realizat folosind metoda spectrofotometrică [5,8] pentru derivatizarea compușilor p-nitrofenil butirat (p-NPB), respectiv, p-nitrofenil stearat (pNFS) și p-nitrofenil palmitat (pNFP). Amestecul de reacție conținând 2,5 mM p-NPB dizolvat în etanol, 1:4 v/v soluție enzimatică și 32,5 mM Tris-HCl pH 7.2 a fost incubat 30 min la 25°C . Stoparea reacției s-a efectuat prin incubare cu 20 mM NaCO_3 timp de 10 min. Absorbanta produsului de reacție a fost măsurată la lungimea de undă de 347 nm. Calculul activității s-a realizat pe baza unei curbe de calibrare pentru p-nitrofenol în intervalul de concentrații 0.1-0.5 mM (Figura 2). În urma metodei de obținere a lipazei PSL-2 a rezultat o enzimă activă atât pentru reacția de esterificare a p-NPB (Figura 3) cât și a acizilor grași pNFS și pNFP (Figura 4).

Secvența de amino acizi a lipazei PSL-2 din *Psychrobacter* SC65A.3 utilizată în obținerea proteinei recombinante exprimată în *Escherichia coli* reprezentată prin mutantul Ser2Ala al enzimei native:

MANSTVLSVNTLLNKAVKTLNLMSFGQDKNPKSTDINLSDEIIDIEESALQDSREDKGLSI
 KEKILEHHLMTNYQPHLLHYAIKSFGLPTPILESLIKCLDGPTSKQYLHVDAHLRLILAV
 NSKCLKTPLQLIEMSELKRFA TDAVAMQAPKVWQQASDNLLSNLQFHKKGDS AISWQ
 DRTITNADDGDMTIRCYQNETSDNGFGFKKEQTSNPDETVLLFFHGGGFCIGDLNTHHE
 FCHAICEQTGWPVISVDYRLAPEHPAPAAVRDCISAYAWLAEHCEEFGALPSRIVLAGDS
 AGGGLSTLMAQQIITPNKEAWLDLGDEGQKTFDILQGLPHPMAQMPLYPVTDIETDYP
 WELYGEGLLLDHADVAIFDAACLENSPLPRQHILTSPMLGDNRQVCPSYVVAAELDVLR
 DEAFAYANQLKSFGIAVQTHTVLGAPHGFIHFMSVHQRLGQETQHIITGFANFVREIIKTR
 ALLSA

Problema pe care o rezolvă această metodă de obținere a lipazei PSL-2 din *Psychrobacter* SC65A.3 constă în producerea unei noi enzime recombinante adaptate la temperaturi scăzute cu activitate esterazică și lipazică pentru găsirea de soluții într-un spectru larg de aplicații

biotehnologice pentru obținerea de aditivi în industria alimentară și a detergenților, în biotransformări și bioremediere, necesitând reacții de acilare și derivatizare la temperaturi scăzute, în funcție de specificitatea de substrat, stabilitatea și eficiența catalitică a biocatalizatorului.

Referințe bibliografice

1. Joseph, B., et al., Cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2007; 2(2): 39-48. <https://doi.org/10.5897/BMBR2007.0005.402>
2. Mangiagalli, M., et al., The “cold revolution”. Present and future applications of cold-active enzymes and ice-binding proteins. *New Biotechnology*, 2020; 55: 5-11. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.09.003>
3. Reetz M.T. Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002; 6:145–150. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(02\)00297-1](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00297-1)
4. Santiago, M., et al., Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 2016;7: 1408. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01408>
5. Gheorghita GI, Paun VI, Neagu S, Maria GM, Enache M, Purcarea C, Parvulescu VI, Tudorache M. Cold-active lipase-based biocatalysts for silymarin valorization through biocatalytic acylation of silybin. *Catalysts*, 2021; 11(11):1390. <https://doi.org/10.3390/catal11111390>
6. Hashim, N.H.F., et al., Biochemical and structural characterization of a novel cold-active esterase-like protein from the psychrophilic 500 yeast *Glaciozyma antarctica*. *Extremophiles*, 2018; 22(4): 607-616. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1021-z>
7. Paun VI, Banciu RM, Lavin P, Vasilescu A, Fanjul-Bolado P, Purcarea C. Antarctic aldehyde dehydrogenase from *Flavobacterium* PL002 as a potent catalyst for acetaldehyde determination in wine. *Scientific Reports*, 2022; 12(1): 17301. doi: 10.1038/s41598-022-22289-8
8. Moreno, M.D.L.; Garcia, M.T.; Ventosa, A.; Mellado, E. Characterization of *Salicola* sp. IC10 a lipase- and protease-producing extreme halophile. *FEMS Microbiology Ecology*. 2009; 68, 59–7

Secvența de amino acizi a lipazei PSL-2 din *Psychrobacter* SC65A.3 utilizată în obținerea proteinei recombinante exprimată în *Escherichia coli* reprezentată prin mutantul Ser2Ala al enzimei native:

MANSTVLSVNTLLNKAVKTLNLMSFGQDKNPKSTDINLSDEIIDIEESALQDSREDKGLSI
KEKILEHHLMTNYQPHELLHYAIKSFGCLPTPILESLIKCLDGPTSKQYLHVDAHLRLILAV
NSKLKTPLQLIEMSELKRKFATDAVAMQAPKVWQQASDNLLSNLKQFHKKGDSAISWQ
DRTITNADDGDMTIRCYQNETSDNGFGFKKEQTSNPDETVLLFFHGGGFCIGDLNTHHE
FCHAICEQTGWPVISVDYRLAPEHPAPAAVRDCISAYAWLAEHCEEFGALPSRIVLAGDS
AGGGLSTLMAQQIITPNKEAWLDLGDEGQKTFDILQGLPHPMAQMPLYPVTDIETDYP
WELYGEGLLLDHADVAIFDAACLENSPLPRQHILTSPMLGDNRQVCPSYVVAAELDVL
DEAFAYANQLKSFGIAVQHTVVLGAPHGFIHFMSVHQRLGQETQHIITGFANFVREIKTR
ALLSA

REVENDICARI

Revendicări depuse conform
art. 15 alin. 4 din legea nr. 64 / 1991
la data de 08 - 11 - 2022

1. Metoda de obținere a lipazei bacteriene PSL-2 din tulpina bacteriană *Psychrobacter* SC65A3 izolată din gheața de peșteră din Ghețarul Scărișoara. Metoda, conform invenției, constă în etapele de exprimare genică și purificare a enzimei recombinante.
2. Metoda de obținere a lipazei PSL-2 din *Psychrobacter* SC65A3, în condițiile revendicării, se caracterizează prin aceea că utilizează expresia heteroloagă în tulpina *Escherichia coli* BL21(DE3) prin inducție la 15°C cu 0.5 mM IPTG timp de 16 h pentru obținerea enzimei intracelulare solubile. Extractele celulare au fost obținute în tampon 100 mM Tris-HCl pH 8.0.
3. Metoda de obținere a lipazei din *Psychrobacter* SC65A3, în condițiile revendicării, se caracterizează prin aceea că permite purificarea enzimei solubile prin cromatografie de afinitate cu rășină Ni-NTA și eluent 100 mM imdazol în tampon 100 mM Tris-HCl pH 8.0.



DESENE (4)

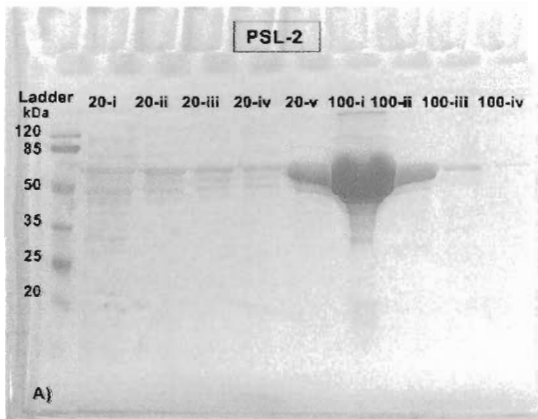


Figura 1. Purificarea lipazei PSL-2 prin cromatografie de afinitate. Extractele celulare de *Escherichia coli* BL21(DE3) care conțin lipaza recombinantă obținută prin inducție la 15°C timp de 16 h în tampon 100 mM Tris-HCl pH 8.0 au fost aplicate pe rășină Ni-NTA și eluate cu tampon suplimentat cu 20 mM imidazol (5 fracții de 1 ml; 20 i-v) și 100 mM imidazol (4 fracții de 1 ml; 100 i-iv).

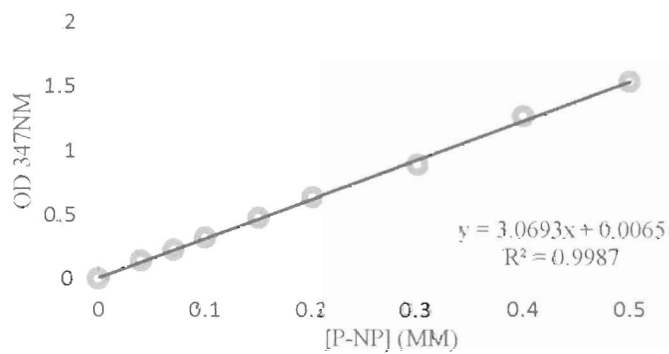


Figura 2. Curba de calibrare pentru p-nitrofenol în intervalul de concentrație 0-0.5 mM

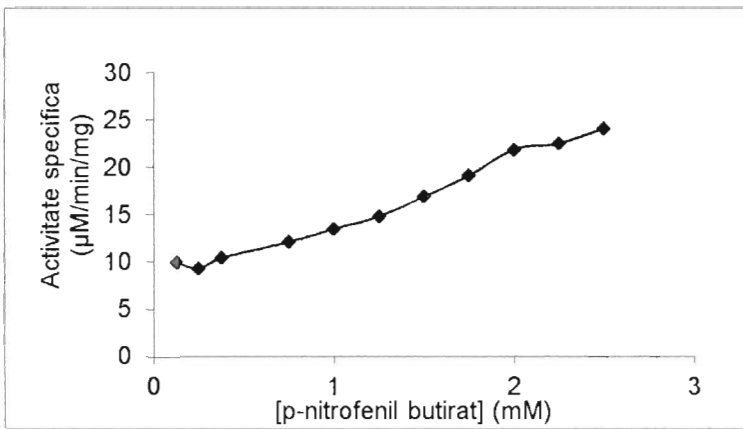


Figura 3. Activitatea specifică a PSL-2 de esterificare a substratului p-nitrofenil butirat măsurată la 25°C

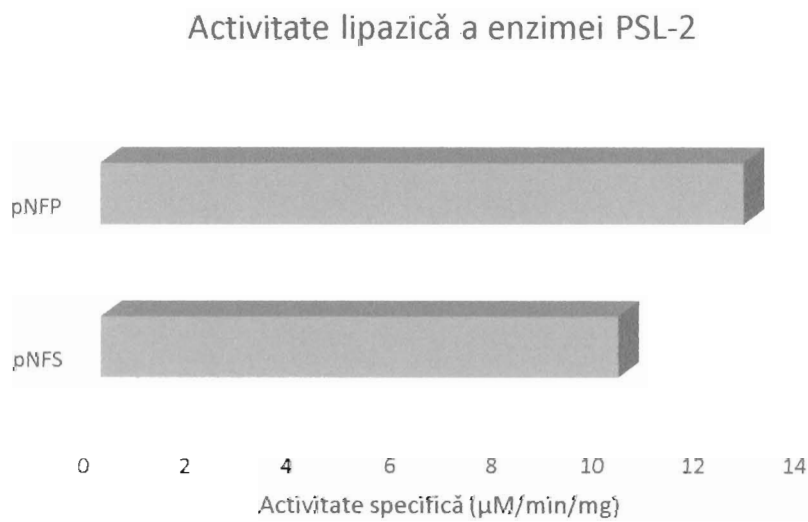


Figura 4. Activitatea lipazică a PSL-2 de acilare a acizilor grași p-nitrofenil stearat (pNFS) și p-nitrofenil palmitat (pNFP) măsurată la 25°C