

**STRATEGIE DE IZOLARE A LIPAZELOR SINTETIZATE DE  
MICROMICETA *ASPERGILLUS NIGER* CNMN FD 01  
CULTIVATĂ ÎN PREZENȚA NANO-DIOXIDULUI TiO<sub>2</sub>**

**<sup>1</sup>Bivol Cezara, <sup>1</sup>Ciloci Alexandra, <sup>1</sup>Tiurina Janeta, <sup>1</sup>Labliuc Svetlana, <sup>1</sup>Dvornina  
Elena, <sup>1</sup>Clapco Steliana, <sup>2</sup>Gușul Tatiana, <sup>2</sup>Rusu Emil**

*<sup>1</sup>Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Republica Moldova*

*<sup>2</sup>Institutul de Inginerie Electronică și Nanotehnologii “D. Ghițu”, Republica Moldova*

**Rezumat**

Lucrarea prezintă rezultatele studiului de evidențiere a condițiilor optime de izolare a enzimelor lipolitice din lichidul cultural (LC) al micromicetei *Aspergillus niger* CNMN FD 01, cultivate în prezența a 10 mg/l nano-oxid TiO<sub>2</sub> cu dimensiunea 40 nm. A fost stabilit că raportul LC:etanol de 96 % de 1:3, pH-ul mediului de reacție 7,0 și durata de contact LC:etanol de 2 ore asigură obținerea preparatelor lipolitice cu activitate enzimatică mai înaltă cu 50 % față de preparatele-martor obținute standard. Parametrii evidențiați de izolare a lipazelor prezintă rentabilitate din punct de vedere al resurselor materiale utilizate și al timpului investit.

Cuvinte cheie: *Aspergillus niger*, lipaze, nanoparticule, lichid cultural, izolarea exoenzimelor

Depus la redacție 15 martie 2019

Adresa pentru corespondență: Bivol Cezara, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, R. Moldova; E-mail: bivolcezara@yahoo.com; tel. (+373 22) 739824.

### Introducere

Lipazele (triacilglicerol acilhidrolazele EC 3.1.1.3) fac parte din familia hidrolazelor și catalizează hidroliza triacilglicerolului până la glicerol și acizi grași. În plus, lipazele catalizează sinteza, hidroliza și transesterificarea esterilor și posedă proprietăți enantioselective [17].

În natură enzimele lipolitice sunt omniprezente și sunt disponibile din diferite surse animale, vegetale și microbiene. Lipazele microbiene au utilizare industrială directă datorită capacității lor de a rămâne active în solvenți organici, la temperaturi ridicate și pH extrem [13]. De asemenea, ele posedă proprietăți enzimatiche versatile și specifice de substrat. Lipazele sunt utilizate la prelucrarea produselor alimentare, pieilor, fibrelor textile, fabricarea detergenților, hârtiei, sinteza substanțelor chimice, producerea preparatelor farmaceutice, cosmetice, a biocombustibililor etc. [3]. Lipazele se aplică la biodegradarea deșeurilor grase [12] și poliuretanului [18].

Producători importanți de lipaze sunt fungii miceliali din genurile *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Candida*, *Mucor* [14, 19].

Sunt cunoscute un șir de metode de izolare și purificare a enzimelor, inclusiv lipolitice, printre care: fracționarea cu solvenți organici, salifierea, dializa, gel-filtrarea, cromatografia de schimb ionic, cromatografia de afinitate, focusarea isoelectrică, electroforeza etc., utilizarea cărora depinde de viitoarele aplicări ale enzimelor [1, 16]. De asemenea, deosebit de purificarea preparativă, care se aplică în cazul obținerii unor cantități industriale de enzime, și purificarea analitică, efectuată la scară relativ mică în laborator, în scop teoretic, investigativ. Practic, fiecare tehnică de separare, purificare a enzimelor necesită selectare și optimizare pentru fiecare produs în parte, fiind dependentă de proprietățile acestuia și de gradul de purificare scontat.

O metodă tradițională de separare a enzimelor din soluție este fracționarea cu solvenți organici (alcool etilic, alcool izopropilic, acetonă). Deși mai puțin aplicată în ultimul timp din cauza pericolului de denaturare a enzimelor, această metodă are un șir de avantaje practice comparativ cu alte tehnici cunoscute, în special randamentul sporit de enzime obținute [9]. Acetona nu este recomandată pentru izolarea enzimelor destinate industriei alimentare sau medicinei datorită toxicității sale. În aceste scopuri cel mai utilizat este alcoolul etilic [8, 10]. Acesta asigură o puritate relativ înaltă a produsului și poate fi ușor înlăturat din preparatul finit prin liofilizare. Iar potențialul pericol de denaturare a proteinelor poate fi evitat prin utilizarea soluțiilor cu temperatură mai joasă de 0 °C [15].

Cercetările recente efectuate în laboratorul Enzimologie al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie au evidențiat nano-dioxidul TiO<sub>2</sub> ca potențial stimulator al biosintezei enzimatică la micromicetele *Aspergillus niger* CNMN FD 01, *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03, *Trichoderma koningii* CNMN FD 15 [2, 22, 23].

Scopul investigațiilor a constat în selectarea strategiei de izolare a lipazelor sintetizate

de tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 01 la cultivare în prezența nanoparticulelor  $\text{TiO}_2$  ca factor stimulator.

### Materiale și metode

Obiect de studiu a servit tulpina de funghi miceliali *Aspergillus niger* CNMN FD 01 cu semnificație biotehnologică, distinsă prin capacitate înaltă și stabilă de sinteză a lipazelor exocelulare [7]. Cultura se păstrează în Colecția Națională de Microorganisme Neputogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie.

Cultivarea submersă a tulpinii a fost efectuată în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 0,5 L cu 100 ml mediu nutritiv, pe agitatoare cu viteza de rotație 180-200 rot./min., la temperatura de 28-30 °C. Durata de cultivare a constituit 5 zile – perioadă de acumulare maximală a lipazelor la cultura dată [4]. Mediul lichid de fermentare a fost însămânțat cu inocul cu densitatea  $2-3 \times 10^6$  spori/ml, obținut prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturii de 14 zile, crescută pe coloane oblice de malț-agar. Cantitatea inoculului în fiecare balon a constituit 10 % v/v.

În calitate de mediu-martor a fost utilizat mediul cu componența (g/l): faină de soia - 35,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 5,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 1,0; pH 7,0-7,2.

În calitate de medii optimizate a fost utilizat mediul de bază suplimentat cu nanoparticulele  $\text{TiO}_2$  cu dimensiunea 40 nm, în concentrație de 10 mg/l. Nanoparticulele au fost introduse în mediul de cultivare concomitent cu materialul de inoculare. Nanomaterialele au fost sintetizate în cadrul Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii „D. Ghițu”. Valorile pH-ului mediului de cultivare au fost determinate cu utilizarea pH-metrului InoLab.pH-720 WTW Germania (2001).

Izolarea lipazelor din lichidul cultural (LC) al micromicetei *A. niger* CNMN FD 01, separat de miceliu prin filtrare, a fost efectuată prin sedimentarea cu alcool etilic de 96% răcit la -15°C. Rapoartele LC:etanol de 96% au fost de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5. Valorile pH-ului de sedimentare au fost 4,0, 6,0, 7,0 și 9,0. Durata de contact dintre lichidul cultural și alcoolul etilic de 96% a fost de 1, 2 și 3 ore. Modificările în condițiile de izolare a enzimelor au fost efectuate pentru determinarea valorilor optime de recuperare maximă a lipazelor.

Sedimentul a fost separat din mediul de reacție prin centrifugare timp de 20 min. la 6000 rpm.

Cantitatea precipitatului, în g/l, a fost determinată gravimetric după uscarea la temperatura camerei (20-22 °C).

Activitatea lipolitică a fost dozată prin metoda modificată Otto-Yamad, după gradul de hidroliză a uleiului de masline în soluție de alcool polivinilic până la acidul oleinic. O unitate de activitate lipolitică a fost considerată cantitatea de enzime (cantitatea de preparat enzimatic) care determină formarea 1  $\mu\text{mol}$  acid oleinic din emulsia de 40 % ulei de măsline în alcool polivinilic în condițiile unui pH de 7,2 și temperaturii de 37 °C în decurs de 1 oră [20].

Experimentele au fost efectuate în trei repetări, datele prezentate fiind media aritmetică a determinărilor, calculată conform  $p \leq 0,05$  [21].

### Rezultate și discuții

Cercetările anterioare efectuate în cadrul laboratorului Enzimologie al IMB de evidențiere a unor strategii eficiente de obținere a preparatelor enzimactice în baza

fungiilor miceliali au elucidat necesitatea selectării și optimizării condițiilor de separare a enzimelor.

Pentru obținerea preparatului enzimatic cu activitate  $\beta$ -glucozidazică din tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 10 a fost elaborat un procedeu de izolare a  $\beta$ -glucozidazelor din lichidul cultural al micromicetei ce include acidifierea mediului de reacție până la pH-ul 3,0, tratarea cu alcool etilic rectificat răcit până la temperatura de -10, -12°C, în raport optim de 1:2, urmat de centrifugarea preparatului. Procedeu propus a asigurat obținerea unui preparat enzimatic parțial purificat, cu nivel înalt al activității  $\beta$ -glucozidazelor, de cel puțin 1525 u/g [6]. Pentru producătorul *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 a fost evidențiată o strategie de recuperare a proteazelor din lichidul cultural al tulpinii prin precipitare cu alcool etilic în raportul optim stabilit de 1:4. pH-ul mediului de sedimentare de 4,0-5,0 a fost selectat preferențial pentru separarea proteazelor acide și pH-ul 6,0-8,0 – pentru separarea proteazelor neutre [5].

În același context, pentru obținerea preparatelor enzimatice cu activitate lipolitică, au fost investigate diferite rapoarte ale lichidului cultural și etanol 96 %, diferite valori ale pH-ului mediului de reacție și influența duratei de contact lichid cultural:etanol.

Toate rapoartele de lichid cultural și etanol studiate au asigurat obținerea unor preparate enzimatice ce au manifestat activitate lipolitică (Tabelul 1). Cea mai înaltă activitate lipolitică a fost observată pentru raportul LC:etanol de 1:3, iar cea mai sporită productivitate de enzime a fost înregistrată pentru raportul de 1:4. Activitatea lipolitică a preparatelor obținute la cultivarea micromicetei în prezența nanoparticulelor de  $\text{TiO}_2$  a variat semnificativ, fiind cu 50,0 % mai înaltă decât în preparatele obținute la cultivarea standard a tulpinii *A. niger* CNMN FD 01. Cantitatea de enzime în variantele experimentale, extrase din lichidul cultural cu etanol în raport LC:etanol de 1:4, se majorează cu 16,45 % față de varianta martor. S-a observat o diferență între raportul LC: etanol care a demonstrat cea mai înaltă activitate lipolitică și cel care a extras cea mai înaltă cantitate de preparat enzimatic atât în probele martor, cât și în cele experimentale. Activitatea lipazelor în variantele optimizate, înregistrată pentru raportul LC:etanol de 1:4, care a indicat cea mai semnificativă productivitate de preparat, a rămas totuși mai înaltă cu 25,0% decât cea mai înaltă activitate lipolitică demonstrată de variantele martor la raportul LC:etanol de 1:3. Cele mai scăzute rezultate au fost observate pentru raportul 1:1 al LC și etanolului.

**Tabelul 1. Cantitatea și activitatea lipolitică a preparatelor enzimatice obținute din lichidul cultural al *A. niger* CNMN FD 01 la varierea raportului lichid cultural:etanol.**

Raportul LC: etanol	Varianta martor		Varianta experimentală cu $\text{TiO}_2$	
	Activitatea lipolitică, u/g	Productivitatea, g/l	Activitatea lipolitică, u/g	Productivitatea, g/l
1:1	312500	3,60	400000	4,20
1:2	437000	4,58	625000	4,84
1:3	500000	5,04	750000	5,50
1:4	437000	6,08	625000	7,08
1:5	400000	6,00	562500	6,90

Indicele pH-ului de sedimentare a influențat semnificativ activitatea lipolitică și randamentul preparatelor obținute (Tabelul 2). A fost observat că pH-ul mediului

de reacție evident acid 4,0 și bazic 9,0 a redus activitatea enzimatică a preparatelor obținute. Cele mai ridicate valori ale activității lipolitice au fost stabilite pentru pH-ul slab acid 6,0 și neutru 7,0. Și în acest caz variantele optimizate cu nano-TiO<sub>2</sub> au prezentat rezultate mai sporite față de preparatele obținute la cultivarea clasică a *A. niger* CNMN FD 01. Activitatea lipazelor în preparatele enzimatic experimentale, obținute prin sedimentare cu etanol 96 % la pH 7,0 a fost cu 50,0 % mai înaltă decât activitatea lipolitică a preparatelor martor obținute în aceleași condiții ale pH-ului.

**Tabelul 2. Cantitatea și activitatea lipolitică a preparatelor enzimatic obținute din lichidul cultural al micromicetei *A. niger* CNMN FD 01 cu diferit indice pH.**

pH	Varianta martor		Varianta experimentală cu TiO <sub>2</sub>	
	Activitatea lipolitică, u/g	Productivitatea, g/l	Activitatea lipolitică, u/g	Productivitatea, g/l
4,0	275000	4,38	325000	5,06
6,0	475000	4,90	725000	5,41
7,0	500000	5,42	750000	5,76
9,0	250000	7,20	312000	7,58

Cantitate maximală de preparat enzimatic a fost obținută la pH-ul bazic 9,0, al soluției de extracție, indiferent de metoda de cultivare utilizată, care a scăzut odată cu reducerea pH-ului de sedimentare, cele mai reduse valori înregistrându-se la pH-ul acid 4,0. Cantitatea preparatelor experimentale obținute a rămas practic nemodificată, în limita erorii de determinare (diferență de 5,27 % la pH 9,0), sau ceva mai înalt (cu cea mai semnificativă diferență de 15,52 % la pH 4,0) decât cantitatea preparatelor martor. Pentru pH-ul 7,0 cantitatea preparatelor în varianta experimentală a fost cu 31,59 % mai scăzută decât cantitatea aceluiași tip de preparat obținut la pH-ul 9,0. Activitatea lipolitică a fost, însă, de 2,4 ori mai înaltă la pH-ul neutru 7,0 decât cea determinată la pH-ul de sedimentare 9,0.

Durata de contact dintre lichid cultural și etanol, de asemenea, a exercitat influență asupra activității lipolitice și cantității preparatelor obținute (Tabelul 3). Durata de contact de 1 oră a prezentat cele mai reduse valori. Prolungirea duratei de contact la 2 ore a favorizat atât sporirea activității enzimatic, cât și a randamentelor de preparat, indiferent de tipul cultivării utilizat. Rezultatele obținute la reacționarea LC:etanol de 3 ore au fost identice cu cele obținute pentru durata de contact de 2 ore. Recomandăm pentru aplicarea în practică a duratei de reacționare LC:etanol de 2 ore, care respectă principiul economiei resurselor și avantajului comparativ [11].

**Tabelul 3. Cantitatea și activitatea lipolitică a preparatelor enzimatic obținute din lichidul cultural al *A. niger* CNMN FD 01 la varierea duratei de contact LC:etanol.**

Durata de contact, ore	Varianta martor		Varianta experimentală cu TiO <sub>2</sub>	
	Activitatea lipolitică, u/g	Productivitatea, g/l	Activitatea lipolitică, u/g	Productivitatea, g/l
1	312000	3,60	400000	4,20
2	500000	5,04	750000	5,50
3	500000	5,06	750000	5,50

Preparatele experimentale, obținute prin cultivarea tulpinii *A. niger* CNMN FD 01 în prezența nanoparticulelor TiO<sub>2</sub> au manifestat activitate lipolitică cu 50,0 % mai înaltă decât cele martor pe fundalul majorării cu 9,13 % a cantităților lor

Rezultatele obținute confirmă studiile precedente în care a fost evaluată acțiunea stimulatorie a nano-oxidului metalici, și, în special, a nano-oxidului TiO<sub>2</sub> asupra capacității de biosinteză a lipazelor la producătorul *A. niger* CNMN FD 01 [2, 4].

Rezumând rezultatele expuse, putem menționa că condițiile de recuperare a lipazelor din lichidul cultural al micromicetei care au prezentat cele mai înalte valori ale activității lipolitice nu întotdeauna corespund cu condițiile în care au fost obținute cele mai semnificative valori ale randamentului de preparat. Importanță covârșitoare posedă indicele de activitate enzimatică care exprimă de fapt funcționalitatea preparatului și gradul mai înalt de puritate.

### Concluzii

Condițiile optime de izolare a enzimelor lipolitice din lichidul cultural (LC) al micromicetei *Aspergillus niger* CNMN FD 01 cultivată în prezența a 10 mg/l nano-oxid TiO<sub>2</sub> cu dimensiunea 40 nm sunt:

- raportul LC:etanol 1:3;
- pH-ul mediului de reacție 7,0;
- durata de contact LC:etanol 2 ore.

Parametrii evidențiați determină obținerea preparatelor lipolitice cu activitate enzimatică mai înaltă cu 50 % decât activitatea lipolitică determinată în preparatele-martor, obținute standard.

### Bibliografia

1. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. Biochemistry, 5th edition. New York: W H Freeman, 2002. Section 4.1, The Purification of Proteins Is an Essential First Step in Understanding Their Function. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22410/>.
2. Bivol, C., Ciloci, A., Tiurina, J., Labliuc, S., Clapco, S., Dvornina, E., Guțul, T., Rusu, E. Effect of nano-oxides TiO<sub>2</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger* CNMN-FD-01 micromycete. Buletinul AȘM, Seria Științele vieții. 2017, 2(332), p. 125-130.
3. Choudhury, P., Bhunia, B. Industrial application of lipase: a review. //Biopharm Journal, 2015, 1(2), p. 41-47.
4. Ciloci, A. Bivol, C., Tiurina, J., Guțul, T., Clapco, S.; Labliuc, S., Dvornina, E., Rusu, E. Procedeu de cultivare a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 01 producător de lipase. Brevet de invenție MD 4566. 2018.05.31.
5. Clapco, S., Bivol, C., Ciloci, A. Partial purification of proteolytic enzymes from *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 fungal strain. Материалы научно-практической конференций с международным участием «Актуальные вопросы биологии, экологии, медицины и фармакологии». Харьков, 26-27 сентября, 2013, с. 56-57.
6. Deseatnic-Ciloci, A. Tiurina, J., Clapco, S., Labliuc, S., Bivol, C., Grumeza, M. Procedeu de obținere a unui preparat enzimatic cu activitate β-glucozidazică. MD 4388, BOPI nr. 12/2015.
7. Deseatnic-Ciloci, A., Sîrbu, T., Tiurina, J., Labliuc, S. Tulpină de fungi *Aspergillus niger* producătoare de enzime lipolitice. Brevet de invenție MD 2362, BOPI 2004.01.31.
8. Freeman, M. E., Anderson, P., Webster, M.E., Dorfman, A. Ethanolic fractionation of bovine testicular hyaluronidase.//J. Biol. Chem., 1950, no. 186, p. 201-206.
9. Fukumoto, J., Tsuru, D., Yamamoto, T. Studies on mold protease.//Agricultural and Biological Chemistry, 1967, 31(6), p. 710-717.
10. Gillespie, M., Wood, E.F. Enzymes of *Aspergillus oryzae*. V. Ethanol fractionation at low ionic strengths.//Australian Journal of Biological Sciences, 1953, no. 6, p. 447-462.

11. Heyne P.L., Boettke P.J., Prychitko D. L. The Economic Way of Thinking (13th Edition). U.S.: Pearson Education, 2013, 456 p.
12. Karigar, C.H., Rao, S.S. Role of Microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review.//Enzyme Research, 2011, p.1-11.
13. Kumar, D. S., Ray, S. Fungal lipase production by solid state fermentation-an overview. Anal. Bioanal. Tech., 2014, 6(1), p. 1-10.
14. Reinehr, C.O., Tres, M.V., Steffens, J., Brião, V.B., Colla, L.M. Successive membrane separation processes simplify concentration of lipases produced by *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. //Bioprocess and Biosyst. Eng., 2017, 40(6), p. 843-855.
15. Shanmugam, S. Enzyme Technology. New Delhi: I. K. International Pvt Ltd, 2009. 232 p.
16. Shukor, Y. Basic enzyme purification with work example. Malaysia: Hibiscus Publisher, 2014. 71 p.
17. Singh, A.K., Mukhopadhyay, M. Overview of fungal lipase: A review.//Appl. Biochem. Biotechnol., 2012, 166, p. 486-520.
18. Takamoto, T., Shirasaka, S., Uyama, H., Kobayashi, S. Lipase-catalyzed hydrolytic degradation of polyurethane in organic solvent.//Chem. Lett., 2001, no.6, p. 492-493.
19. Verma, N., Thakur, S., Bhatt, A.K. Microbial lipases: industrial applications and properties (A review).//Int. Res. J. Biological Sci., 2012, 1(8), p. 88-92.
20. Грачёва, И.М., Грачев, Ю.П. и др. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М.: Легкая и пищ. пром., 1982. с. 75-76.
21. Доспехов, Б. Планирование полевого опыта и статистическая обработка данных. М.: Колос, 1985, с. 192-196.
22. Чилочи, А., Тюрина, Ж., Лаблюк, С., Дворнина, Е., Клапко, С., Бивол, Ч., Гуцул, Т., Руссу, Е. Особенности биосинтеза липаз микромицетом *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03 под влиянием наночастиц окислов некоторых металлов.//Buletinul AŞM, Seria Ştiinţele vieţii, 2017, 2(332), p. 116-125.
23. Чилочи, А., Тюрина, Ж., Лаблюк, С., Дворнина, Е., Клапко, С., Бивол, Ч., Гуцул, Т., Руссу, Е., Никорич, А. Влияние нано окислов некоторых металлов на биосинтез внеклеточных гидролаз микромицетов.//Buletinul AŞM, Seria Ştiinţele vieţii, 2016, 3(330), p. 164-171.

**Cercetările au fost realizate în cadrul Proiectului pentru tineri cercetători 16.80012.51.12A (2016-2017).**