

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

Școala doctorală de Inginerie



TEZĂ DE DOCTORAT

Comportamentul cinetic și molecular al unor enzime oxidative din perspectiva stabilirii relației proces-structură-funcție (Rezumatul tezei de doctorat)

**Doctorand,
Elena IONIȚĂ**

**Conducător științific,
Prof.univ.dr.ing Gabriela Elena BHRIM**

Seria I.1: BIOTEHNOLOGII Nr. 6

GALAȚI

2016

Seriile tezelor de doctorat susținute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunt:

Domeniul **ȘTIINȚE INGINEREȘTI**

Seria I 1: **Biotehnologii**

Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**

Seria I 3: **Inginerie electrică**

Seria I 4: **Inginerie industrială**

Seria I 5: **Ingineria materialelor**

Seria I 6: **Inginerie mecanică**

Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**

Seria I 8: **Ingineria sistemelor**

Domeniul **ȘTIINȚE ECONOMICE**

Seria E 1: **Economie**

Seria E 2: **Management**

Domeniul **ȘTIINȚE UMANISTE**

Seria U 1: **Filologie- Engleză**

Seria U 2: **Filologie- Română**

Seria U 3: **Istorie**

MULȚUMIRI

Acum, la finalul stagiului doctoral, mă simt profund marcată de sentimente de fericire și împlinire care provin din mulțumirea profesională și personală a studiilor duse la bun sfârșit.

Pe această cale, doresc să le mulțumesc tuturor acelor oameni minunați care mi-au oferit consultanță științifică și care și-au rupt din timpul lor liber pentru a-mi oferi sprijin și ajutor.

Doamnei **prof. dr. ing. Gabriela Bahrim** sincere mulțumiri și sentimente de recunoștință pentru sprijinul acordat în elaborarea tezei de doctorat, pentru răbdarea, generozitatea, și înțelegerea dvs., precum și pentru întreaga contribuție la formarea mea ca cercetător. Vă mulțumesc pentru faptul că ați acceptat să-mi împărtășiți din bogata dumneavoastră experiență dobândită de-a lungul anilor de studiu iar fără sprijinul dumneavoastră nu aș fi putut realiza această teză.

Deosebită grațitudine datorez membrilor **comisiei de îndrumare: prof. univ. dr. ing Gabriela Râpeanu, prof. univ. dr. ing. Nicoleta Stănciuc, prof. univ. dr. ing. Iuliana Aprodu** pentru timpul prețios acordat, pentru sfaturile științifice valoroase cât și pentru îndrumarea competentă și permanentă pe parcursul elaborării și realizării acestei teze de doctorat.

Mulțumesc distinșilor **referenți oficiali prof. univ. dr. biochim. Anca Dinischiotu**, Universitatea din București, și **prof. univ. dr. biochim. Simona Oancea**, Universitatea „Lucian Blaga” din Sibiu, pentru onoarea acordată de a recenza această lucrare.

Această teză de doctorat nu ar fi fost completă fără ajutorul esențial al **ș.l. dr. biolog. Leontina Gurgu** și **dr.ing. Laura (Iancu) Leonov**, cărora țin să le mulțumesc pentru timpul și sfaturile științifice prețioase acordate, adresându-le pe această cale recunoștința mea.

Mulțumiri cordiale **doamnei conf. dr. ing. Margareta Zara** și **profesorilor mei din perioada facultății și a cursurilor de master**, care mi-au îndreptat pașii spre domeniul cercetării științifice.

În mod deosebit aș dori să mulțumesc actualilor mei colegi (**drd. Mihaela Turturică, drd. Carmen Bolea, drd. Mihaela Ursache, drd. Ana Maria Oancea, drd. Monica Găureanu, drd. Mihaela Apetrei**), cât și foștilor colegi de doctorat (**dr. biolog Claudia Ungureanu, dr. chimist Ioana Ghinea, asis. univ. dr. ing. Georgiana Horincar**) care m-au sprijinit și încurajat în fiecare moment dificil și alături de care am beneficiat de un cadru ambiental foarte plăcut.

Pe parcursul stagiului doctoral, la formarea mea personală și profesională au contribuit, de asemenea, o serie de oameni deosebiți: **conf. dr. biolog Vasilica Barbu, asis. univ. dr. chim. Simona Patriche, dr. ing. Mihaela Cotârleț, tehn. Mihaela Dimitriu, conf.dr.ing. Aida Vasile, dr. ing. Gigi Coman, dr. ing. Ana-Maria Ciuciu, asis. univ. dr. ing. Loredana Dumitrașcu, asis. univ. dr. ing. Oana Nistor**, cărora le adresez nenumărate mulțumiri.

Cu deosebită recunoștință și dragoste, dedic această teză lui **Marius și părinților mei**, care au fost alături de mine, m-au înconjurat cu afecțiunea și răbdarea lor și care m-au sprijinit din toate punctele de vedere în această perioadă.

Vă mulțumesc!

Drd. Elena Ioniță

Cuprins

Introducere	1
I. Studiul documentar	9
1. Impactul enzimelor oxidative asupra transformării compușilor fenolici din surse vegetale.....	10
1.1. Considerații generale	10
1.2. Efectul reacțiilor enzimatică asupra compușilor fenolici din fructe și legume	11
2. Caracteristicile principalelor enzime implicate în oxidarea compușilor fenolici	14
2.1. Considerații generale	14
2.2. Caracteristicile biochimice ale polifenoloxidazelor	14
2.2.1. Clasificarea tirozinazelor	16
2.2.2. Caracteristicile tirozinazei din <i>Agaricus bisporus</i>	17
2.3. Caracterizarea biochimică a peroxidazelor	25
2.3.1. Clasificarea peroxidazelor	26
2.3.2. Peroxidaza din <i>Armoracia rusticana</i>	27
2.3.3. Proprietățile biochimice și moleculare ale peroxidazelor	28
3. Impactul procesării asupra enzimelor oxidative din surse vegetale.....	33
3.1. Tratamentul termic.....	33
3.1.1. Considerații generale	33
3.1.2. Efectul tratamentului termic asupra enzimelor oxidative	34
3.1.3. Stabilitatea termică a enzimelor oxidative.....	35
3.2. Tratamentul la presiune înaltă.....	36
3.2.1. Considerații generale	36
3.2.2. Efectul tratamentului la presiune înaltă asupra enzimelor oxidative.....	37
3.2.3. Stabilitatea la presiune înaltă a enzimelor oxidative	38
3.3. Tratamentul cu ultrasunete	39
3.3.1. Considerații generale	39
3.3.2. Efectul tratamentului cu ultrasunete asupra enzimelor oxidative.....	40
3.3.3. Stabilitatea la tratamentul cu ultrasunete a enzimelor oxidative.....	40
3.4. Tratamentul în câmp electric pulsatoriu	41
3.4.1. Considerații generale	41
3.4.2. Efectul tratamentului în câmp electric pulsatoriu asupra enzimelor oxidative.....	41
3.4.3. Stabilitatea enzimelor oxidative în câmp electric pulsatoriu	43
Referințe bibliografice	45

II. PARTEA EXPERIMENTALĂ	54
4. Evaluarea proprietăților moleculare și a comportamentului unor enzime oxidative comerciale prin spectrofotometrie de luminescență și analiză moleculară <i>in silico</i>	55
4.1. Studiul comportamentului biochimic și molecular al tirozinazei comerciale (<i>Agaricus bisporus</i>).....	55
4.1.1. Introducere.....	55
4.1.2. Materiale și metode	56
4.1.2.1. Reactivi	56
4.1.2.2. Tratamentul termic.....	56
4.1.2.3. Determinarea activității enzimaticе	56
4.1.2.4. Cinetica de inactivare termică.....	56
4.1.2.5. Tratamentul la diferite valori de pH	57
4.1.2.6. Tehnici de spectroscopie de fluorescență	57
4.1.2.7. Tehnici de analiză <i>in silico</i>	60
4.1.2.8. Analiza statistică.....	61
4.1.3. Rezultate și discuții	62
4.1.3.1. Influența pH-ului asupra modificărilor conformaționale ale tirozinazei	62
4.1.3.2. Efectul temperaturii asupra modificărilor conformaționale ale tirozinazei	71
4.1.3.3. Specificitatea de substrat și inhibiția tirozinazei	82
4.1.3.4. Cinetica de inactivare a tirozinazei	89
4.2. Studiul comportamentului biochimic și molecular al peroxidazei comerciale (<i>Armoracia rusticana</i>).....	92
4.2.1. Introducere.....	92
4.2.2. Materiale și metode	92
4.2.2.1. Reactivi	92
4.2.2.2. Tehnici de spectroscopie de fluorescență	92
4.2.2.3. Determinarea activității enzimaticе	93
4.2.2.4. Tehnici de analiză <i>in silico</i>	93
4.2.2.5. Cinetica de inactivare	94
4.2.2.6. Analiza statistică.....	94
4.2.3. Rezultate și discuții	95
4.2.3.1. Influența pH-ului asupra comportamentului molecular și cinetic al peroxidazei.....	95
4.2.3.2. Efectul temperaturii asupra comportamentului peroxidazei.....	100
4.2.3.3. Evaluarea specificității de substrat și a inhibiției peroxidazei prin andocare moleculară.....	111
4.2.3.4. Cinetica de inactivare a peroxidazei	117

4.3. Concluzii parțiale	119
Referințe bibliografice	122
5. Caracterizarea proprietăților catalitice ale enzimelor oxidative extrase din prune (<i>Prunus domestica</i>).....	127
5.1. Caracterizarea polifenoloxidazei din prune	129
5.1.1. Introducere.....	129
5.1.2. Materiale și metode	130
5.1.2.1. Materiale și echipamente.....	130
5.1.2.2. Tehnici de extracție și purificare parțială a enzimelor oxidative din prune	130
5.1.2.3. Determinarea activității enzimatică	133
5.1.2.4. Determinarea conținutului de proteine prin metoda Bradford	133
5.1.2.5. Evidențierea polifenoloxidazei prin electroforeză în gel și determinarea masei moleculare.....	134
5.1.2.6. Influența concentrației enzimei	137
5.1.2.7. Specificitatea de substrat și influența concentrației substratului.....	138
5.1.2.8. Efectul pH-ului asupra polifenoloxidazei (pH-ul optim de acțiune și stabilitatea la pH).....	138
5.1.2.9. Efectul temperaturii asupra polifenoloxidazei (temperatura optimă și termostabilitatea)	139
5.1.2.10. Influența inhibitorilor	140
5.1.2.11. Stabilitatea la presiune înaltă a polifenoloxidazei.....	140
5.1.2.12. Analiza statistică.....	141
5.1.3. Rezultate și discuții	141
5.1.3.1. Extracția și purificarea parțială a polifenoloxidazei din prune	141
5.1.3.2. Estimarea masei moleculare a polifenoloxidazei din prune	154
5.1.3.3. Influența concentrației de enzimă asupra activității polifenoloxidazei	156
5.1.3.4. Specificitatea de substrat și influența concentrației substratului.....	156
5.1.3.5. Influența pH-ului asupra polifenoloxidazei din prune.....	159
5.1.3.6. Efectul temperaturii asupra polifenoloxidazei din prune	163
5.1.3.7. Stabilitatea la presiune înaltă a polifenoloxidazei din prune	170
5.1.3.8. Influența inhibitorilor asupra polifenoloxidazei.....	172
5.2. Caracterizarea biochimică a peroxidazei din prune.....	174
5.2.1. Introducere.....	174
5.2.2. Materiale și metode	175
5.2.2.1. Materiale și reactivi.....	175
5.2.2.2. Extracția și purificarea parțială a peroxidazei din prune	175
5.2.2.3. Determinarea activității enzimatică peroxidazice.....	175

5.2.2.4. Determinarea concentrației de proteine	176
5.2.2.5. Evidențierea peroxidazei prin electroforeză în gel de poliacrilamidă și determinarea masei moleculare.....	176
5.2.2.6. Analiza influenței concentrației enzimei	176
5.2.2.7. Testarea specificității și a concentrației de substrat	176
5.2.2.8. Investigarea efectului pH-ului asupra și determinarea pH-ului optim de activitate	177
5.2.2.9. Investigarea termostabilității și a temperaturii optime de acțiune a peroxidazei.....	177
5.2.2.10. Studii de inactivare termică a peroxidazei.....	178
5.2.2.11. Determinarea stabilității la presiune înaltă a peroxidazei	178
5.2.2.12. Testarea influenței compușilor chimici inhibitori	178
5.2.2.13. Analiza statistică.....	178
5.2.3. Rezultate și discuții	178
5.2.3.1. Extracția și purificarea parțială a peroxidazei din prune	178
5.2.3.2. Masa moleculară a peroxidazei din prune	182
5.2.3.3. Influența concentrației de enzimă asupra eficienței procesului de biocataliză	183
5.2.3.4. Influența specificității și a concentrației de substrat.....	184
5.2.3.5. Efectul pH-ului asupra proprietăților catalitice ale peroxidazei	187
5.2.3.6. Efectul temperaturii asupra peroxidazei.....	190
5.2.3.7. Stabilitatea la presiune înaltă a peroxidazei.....	195
5.2.3.8. Influența inhibitorilor asupra peroxidazei.....	197
5.3. Concluzii parțiale	199
Referințe bibliografice	201
6. Concluzii generale.....	201
7. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective.....	219
8. Diseminarea rezultatelor cercetărilor	215
Anexe	223

Introducere

Fructele și legumele prezintă o importanță deosebită în ceea ce privește nutriția și calitatea funcțională a produselor în stare proaspătă sau procesate, prin furnizarea de biomolecule esențiale cum ar fi vitamine, minerale și fibre. Produsele vegetale conțin o mare varietate de compuși biologic activi (polifenoli, antociani, carotenoide) ca metaboliți secundari, compuși cunoscuți pentru proprietățile funcționale. Cu toate că majoritatea fructelor și legumelor sunt consumate în stare proaspătă, acestea sunt consumate, de asemenea, și procesate. Din punct de vedere industrial, procesarea implică optimizarea parametrilor pentru a obține produse de calitate superioară prin îndeplinirea condițiilor de siguranță alimentară (Pilizota, 2014).

Enzimele prezintă o importanță deosebită în biocataliza reacțiilor biochimice în aproape toate procesele biologice. Datorită specificității de substrat, enzimele pot accelera o varietate mare de reacții, identificându-se astfel diferite căi de reacție. În fructe și legume, enzimele joacă un rol important în determinarea indicatorilor de calitate, cum ar fi textura, aroma, culoarea, valoarea nutritivă și proprietățile senzoriale. După recoltare, cele mai multe enzime rămân active în timpul depozitării, catalizând diferite reacții precum oxidarea compușilor biologic activi, astfel observându-se o deteriorare a proprietăților nutritive și calitative ale produselor vegetale.

În industria alimentară, unul dintre cele mai studiate procese este îmbrunarea enzimatică, aceasta fiind considerată cea de-a doua cauză în ceea ce privește deteriorarea produselor vegetale, după contaminarea microbiană. Acest proces constă în oxidarea compușilor fenolici de către enzimele oxidative precum polifenoloxidaza și peroxidaza, ducând la formarea unor pigmenți închiși la culoare, numiți melanine.

Din punct de vedere industrial, este esențială optimizarea parametrilor de procesare pentru a asigura controlul stabilității enzimelor și siguranța alimentară pentru obținerea unor produse bogate în compuși biologic activi la standarde de calitate ridicate.

Aplicațiile enzimelor în industria alimentară în ceea ce privește prelucrarea fructelor și legumelor sunt intens studiate și unanim acceptate dar există încă multe oportunități pentru îmbunătățirea proceselor și pentru identificarea unor noi aplicații. Astfel, evaluarea comportamentului biochimic din punct de vedere structural și identificarea condițiilor de inactivare a enzimelor oxidative permit optimizarea etapelor de procesare și a producției în general.

Cele mai frecvente procese utilizate pentru procesarea produselor alimentare implică tratamentul termic și tratamentul la presiune înaltă precum și tratamentul combinat. Utilizarea unor tratamente eficiente care să asigure stabilitatea și siguranța produselor vegetale este necesară pentru a preveni degradarea microbiană și enzimatică, prin păstrarea culorii, aromei, texturii, precum și a compușilor biologic activi benefici pentru sănătate (Singh și Heldman, 2013). Investigațiile suplimentare privind inactivarea enzimelor prin anumite tratamente este necesară pentru a atinge grade mai ridicate de inactivare, pentru a elucida mecanismul de inactivare enzimatică, precum și pentru a permite optimizarea diferitelor tehnologii de procesare utilizate la scara mai largă.

Teza de doctorat intitulată ***"Comportamentul cinetic și molecular al unor enzime oxidative din perspectiva stabilirii relației proces-structură-funcție"*** a vizat studiul comportamentului enzimelor oxidative precum polifenoloxidaze și peroxidaze din diferite surse vegetale, în vederea caracterizării biochimice și a optimizării parametrilor de inactivare, enzimele fiind considerate responsabile de procesul de îmbrunare enzimatică. Astfel, prin tehnici moderne de analiză precum spectroscopia de fluorescență și modelarea moleculară au fost determinate modificările structurale ale enzimelor comerciale, tirozinaza din *Agaricus bisporus* și peroxidaza

din *Armoracia rusticana*, în sisteme model, sisteme care permit aprecierea comportamentului enzimelor în diferite condiții de reacție. Au fost extrase și purificate parțial polifenoxidaza și peroxidaza din prune autohtone (*Prunus domestica*) și s-au studiat proprietățile catalitice condițiile optime de activitate, precum și stabilitatea la diferite tratamente (temperatură, pH, presiuni înalte). În perspectiva implementării în practică, în industria alimentară, și pentru creșterea eficienței economice a tehnologiilor de procesare, s-au urmărit optimizarea tratamentelor de inactivare pentru stoparea efectului de îmbrunare enzimatică și stabilirea condițiilor optime de activitate, reliefându-se importanța în domeniul industriei alimentare pentru obținerea unor produse procesate minimal care își păstrează proprietățile nutritive și prospețimea.

În acest context, cercetările derulate pe parcursul studiilor de doctorat au vizat următoarele obiective științifice:

- Evaluarea modificărilor conformaționale și structurale induse la nivel molecular, prin modificarea pH-ului și a temperaturii, asupra enzimelor comerciale purificate, tirozinază din *Agaricus bisporus* și peroxidază din *Armoracia rusticana*, din perspectiva stabilirii unor relații proces-structură-funcție.
- Utilizarea tehnicilor avansate de investigare, modelare moleculară și tehnici de andocare, pentru analiza specificității de substrat și a inhibiției enzimelor oxidative, precum și caracterizarea structurală și funcțională a acestora la nivel molecular.
- Separarea și purificarea parțială a enzimelor oxidative din prune autohtone, specia *Prunus domestica*, precum și caracterizarea comportamentului catalitic pentru a determina condițiile optime de activitate.
- Stabilirea condițiilor fizico-chimice pentru inactivarea polifenoxidazei și peroxidazei din prune (*Prunus domestica*) și stabilirea unor modele matematice pentru creșterea eficienței procesului de inactivare prin efectul corelativ al pH-ului, temperaturii și tratamentului la presiune înaltă, în vederea stopării procesului de îmbrunare enzimatică.

Teza de doctorat este structurată în două părți, după cum urmează:

I. STUDIUL DOCUMENTAR, este structurat în 3 capitole și prezintă date recente din literatura de specialitate privind caracteristicile biochimice și tehnologice ale enzimelor oxidative și impactul acestora în industria alimentară. Sunt descrise caracteristicile enzimelor oxidative de tipul polifenoxidazelor și peroxidazelor (clasificare, structură, proprietățile catalitice, mecanismele de reacție), având ca etalon două enzime reprezentative, respectiv, tirozinaza din *Agaricus bisporus* și peroxidaza din *Armoracia rusticana*. Sunt prezentate, de asemenea, cele mai importante tehnici de inactivare asociate procesării produselor vegetale și efectele acestora asupra enzimelor oxidative, corelat cu comportamentul biochimic și stabilitatea acestora.

II. PARTEA EXPERIMENTALĂ, cuprinde rezultatele investigațiilor originale realizate pe parcursul stagiului doctoral și este structurată în două capitole, după cum urmează:

Capitolul 4, intitulat ***Evaluarea proprietăților moleculare și a comportamentului unor enzime oxidative comerciale prin spectroscopie de luminescență și analiză moleculară in silico***, prezintă evaluarea modificărilor structurale, induse de pH și temperatură, la nivelul moleculelor de tirozinază și peroxidază prin utilizarea spectroscopiei de fluorescență și a tehnicilor de modelare moleculară. Studiile au fost realizate utilizând enzime comerciale, în

stare purificată și anume tirozinaza din ciuperci (*Agaricus bisporus*) și peroxidaza din hrean (*Armoracia rusticana*). S-au studiat mecanismele de inactivare a celor două enzime prin efectul tratamentului termic. Astfel, mecanismele de denaturare au fost identificate pe baza spectrelor de emisie prin determinarea intensității fluorescenței, a diagramei de faze și a variației parametrului A, a anizotropiei de fluorescență, experimentele de quenching cu acrilamidă și KI, identificarea situsurilor de legare a 1-anilino-8-naftalensulfonatul (ANS) și determinarea hidrofobicității de suprafață. Efectul inhibitorilor și specificitatea de substrat au fost analizate prin utilizarea unor tehnici de andocare moleculară, reliefându-se importanța modelării comportamentului enzimatic în sisteme model pentru a reda cât mai fidel comportamentul enzimelor *in vivo*.

Capitolul 5, intitulat **Caracterizarea proprietăților catalitice ale enzimelor oxidative extrase din prune (*Prunus domestica*)**, prezintă rezultatele investigațiilor privind extracția, purificarea parțială și caracterizarea biochimică a polifenoxidazei și peroxidazei extrase din prune autohtone, specia *Prunus domestica*, determinarea condițiilor optime de activitate și a stabilității în diferite condiții de pH, temperatură și presiune înaltă, a specificității de substrat și a efectului unor compuși chimici cu rol inhibitor. S-a studiat, de asemenea, cinetica de inactivare prin efectul tratamentului termic, mecanismele de inactivare fiind descrise cu ajutorul modelelor cinetice de ordinul I.

Fiecare capitol al părții experimentale este structurat într-o succesiune logică a următoarelor subcapitole: *Introducere*, în care se prezintă oportunitatea cercetărilor și obiectivele specifice ale studiilor realizate; *Materiale și metode*, în care sunt descrise materialele și reactivii utilizați, precum și metodele de investigare, analiză, de prelucrare și interpretare a datelor experimentale; *Rezultate și discuții*, în care sunt reliefate rezultatele originale obținute, precum și compararea acestora cu date similare din literatura de specialitate; *Concluzii parțiale și Referințe bibliografice*.

Capitolul 6, Concluzii generale, prezintă principalele concluzii rezultate din experimentele realizate ce au vizat caracterizarea mecanismelor funcționalității catalitice și a comportamentului molecular al enzimelor oxidative, comerciale și native, din surse vegetale, prin determinarea parametrilor optimi de activitate, evaluarea modificărilor conformaționale și structurale, precum și previzionarea unor procedee eficiente de inactivare, în condiții controlate, care să asigure stabilitatea și calitatea produselor vegetale în stare naturală sau procesate.

Teza de doctorat cuprinde 238 pagini, în care sunt incluse 87 figuri și 26 tabele. Studiul documentar reprezintă 17 % iar partea experimentală 83 %.

În final, sunt prezentate **contribuțiile originale** ale tezei de doctorat, cu impact în dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspectivele pentru continuarea cercetărilor, precum și diseminarea rezultatelor obținute în domeniul de cercetare abordat. Astfel, rezultatele cercetărilor au fost valorificate prin elaborarea a **6 articole științifice**, publicate sau în curs de publicare în reviste cotate ISI (*Food Chemistry, Journal of the Science of Food and Agriculture, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*) și indexate în baze de date internaționale (*Innovative Romanian Food Biotechnology*) și **7 comunicări** la manifestări științifice reprezentative pentru domeniul biotehnologiei, din străinătate și din țară.

Activitățile de cercetare din cadrul tezei de doctorat au fost derulate cu ajutorul infrastructurii moderne de cercetare a *Centrului integrat de cercetare, expertiză și transfer tehnologic*

(*BioAliment-TehnIA*)(www.bioaliment.ugal.ro), din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea “Dunărea de Jos” din Galați.

Pe parcursul studiilor doctorale, doctoranda a fost implicată în echipa de cercetare a proiectului IDEI, PN-II-ID-PCE-2012-4-0509/2013-2016 (www.biostab.ugal.ro), cu titlul *Thermal and/or non thermal technology as a tool to increase the health functionality of bioactive compounds in fruit based food*, director de proiect profesor dr. ing. Gabriela Râpeanu.

Teza s-a realizat sub coordonarea științifică a comisiei de îndrumare cu următoarea componență:

- **Prof.dr.ing. Gabriela-Elena BHRIM** – conducător de doctorat
- **Prof.dr.ing. Iuliana APRODU** – coordonator studii de modelare și andocare moleculară
- **Prof.dr.ing. Gabriela RÂPEANU** – coordonator studii de extracție, purificare și caracterizare a proprietăților cinetice ale enzimelor oxidative
- **Prof.dr.ing. Nicoleta STĂNCIUC** – coordonator studii de analiză spectrofluorimetrică și cinetica de inactivare a enzimelor

4. Evaluarea proprietăților moleculare și a comportamentului unor enzime oxidative comerciale prin spectrofotometrie de luminescență și analiză moleculară *in silico*

Studiile prezentate în acest capitol descriu o serie de proprietăți conformaționale și de comportament biochimic pentru două enzime oxidative comerciale, tirozinaza produsă de ciuperca *Agaricus bisporus* și peroxidaza din hrean (*Armoracia rusticana*), utilizând spectroscopia de fluorescență și analiza moleculară *in silico*, descriind modificările conformaționale și structurale induse la diferite valori de pH și temperatură, pentru aprecierea relației proces-structură-funcție.

Rezultatele obținute sunt valoroase din punct de vedere fundamental și aplicativ deoarece oferă numeroase informații asupra comportamentului celor două enzime în condițiile uzuale de procesare, cu impact deosebit în știința alimentelor și biotehnologie.

4.1. Studiul comportamentului biochimic și molecular al tirozinazei comerciale (*Agaricus bisporus*)

Tirozinazele sunt metalproteine de tip-3 ce conțin cupru, implicate în etapa inițială de sinteză a melaninei. Aceste enzime catalizează atât *o*-hidroxilarea monofenolilor și oxidarea ulterioară a *o*-difenolilor rezultați în *o*-chinone, cu formarea de compuși intermediari intermediari, precursori ai pigmentilor brun închis. În ciuperci, tirozinazele sunt în general asociate cu sporularea și sunt implicate în mecanismele de antagonism, dar și în îmbrunare și pigmentare.

4.1.2. Materiale și metode

Tirozinaza comercială (*Agaricus bisporus*), fosfatul monosodic, fosfatul disodic, 1-anilino-8-naftalensulfonatul (ANS), iodura de potasiu, acrilamida, clorura de calciu au fost achiziționate de la Sigma (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO). Enzima s-a utilizat ca atare, fără alte etape de purificare. Toți reactivii au avut puritate analitică.

Investigațiile au urmărit:

- Determinarea activității enzimaticice
- Comportamentul la diferite valori de temperatură
- Comportamentul la diferite valori de pH
- Cinetica de inactivare termică
- Analiză prin spectroscopie de fluorescență
- Analiză *in silico* și modelare moleculară

4.1.3. Rezultate și discuții

4.1.3.1. Influența pH-ului asupra modificărilor conformaționale ale tirozinazei

Diagrama de faze

În experimentele efectuate, diagrama de faze a evidențiat existența mai multor specii moleculare, cu un comportament diferit (figura 4.2). După cum se poate observa, diagrama de fază este formată din două părți liniare corespunzătoare valorilor de pH variind între 2,0-5,0 și, respectiv, 6,0-9,0.

Pe baza rezultatelor obținute se poate concluziona că în domeniul de pH acid, predomină disocierea urmată de deplierea formei tetramerică native, care promovează o expunere a resturilor hidrofobe, însoțită de o creștere secvențială a intensității fluorescenței. Când valorile pH-ului cresc de la 6,0 la 9,0, cel mai probabil proteina trece prin câteva forme intermediare structurale tridimensionale, inclusiv tetramer, trimer și dimer.

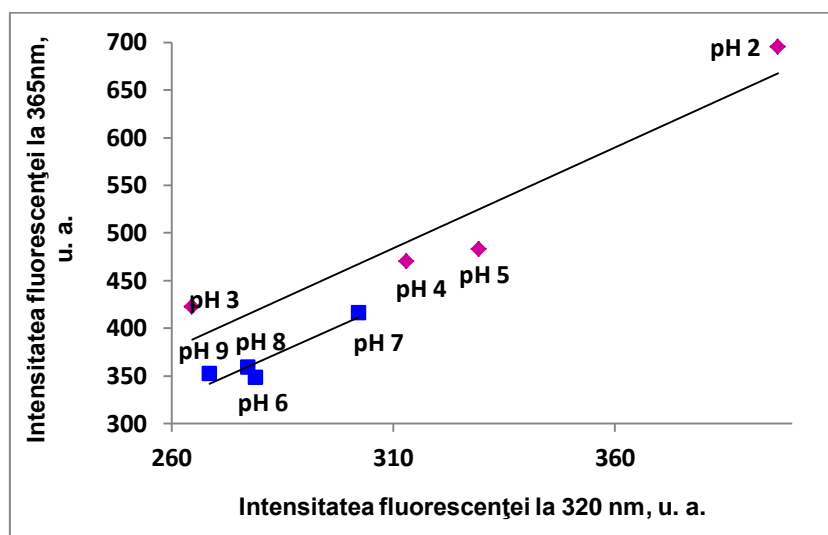


Figura 4.2. Diagrama de fază ce descrie modificările conformaționale ale tirozinazei, induse de un pH diferit, bazată pe valorile intensității fluorescenței intrinsecă măsurate la lungimile de undă 320 și 365 nm. Valorile pH-ului sunt indicate în vecinătatea simbolului corespunzător

Spectre de emisie

Pentru a explica modificările intensității de fluorescență, s-a realizat o cartografiere detaliată la nivel molecular în ceea ce privește localizarea resturilor de Trp și Tyr în molecula tirozinazei. Structura cristalografică a tirozinazei din *Agaricus bisporus* a fost obținută din baza de date a proteinelor (cod 2Y9W.pdb). O verificare detaliată a structurii echilibrate a indicat că subunitățile H mari (392 aminoacizi) ale tirozinazei ce au o organizare complexă la nivel secundar, constând din 13 α -helix, opt β -foi pliate scurte și multe bucle (Ismaya și colab., 2011), are 16 resturi de Trp și 17 resturi de Tyr. Din aceste resturi numai șapte resturi de Trp (localizate în pozițiile 106, 124, 141, 195, 227, 350 și 386) și nouă resturi de Tyr (localizate în pozițiile 51, 65, 78, 140, 165, 236, 311, 314 și 382) sunt complet sau parțial expuse solventului. Cea mai importantă contribuție pentru intensitatea de fluorescență este dată de subunitățile H, în timp ce subunitățile L (150 de aminoacizi) prezintă numai șase resturi Trp și trei resturi de Tyr din care parțial expuse sunt doar resturile formei tetramerică a enzimei Trp¹⁵, Trp⁵⁹ și Trp⁹³.

Prin excitare la lungimea de undă 280 nm, s-a observat (figura 4.4) că intensitatea maximă a fluorescenței a fost înregistrată la valori de pH alcaline (pH 8,0 și pH 9,0), în timp ce valoarea cea mai redusă a fost înregistrată la pH 5,0.

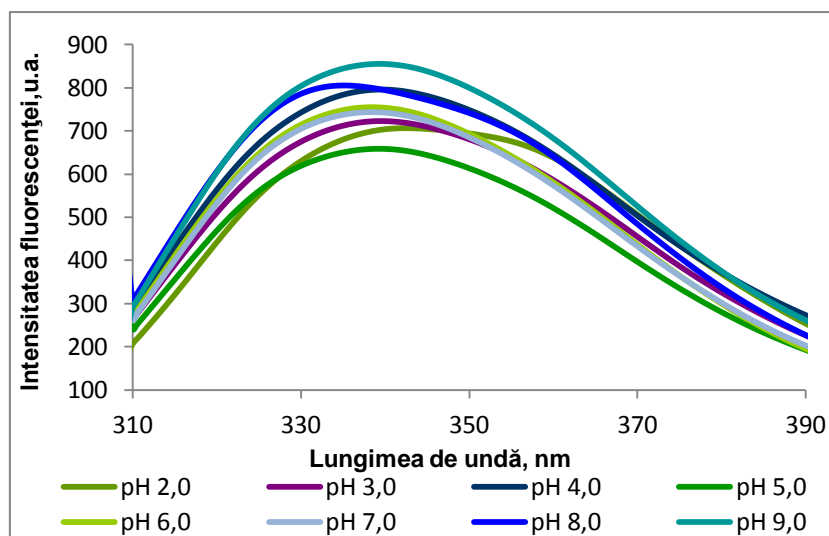


Figura 4.4. Spectrele de emisie obținute la lungimea de undă la excitație de 280 nm, în funcție de diferite valori ale pH-ului

Valoarea maximă a intensității fluorescenței și forma spectrului nu se modifică în funcție de lungimea de undă a excitației. Figura 4.7 prezintă intensitatea maximă de fluorescență a tirozinazei care scade provocând un *red shift* la toate valorile de pH, cu excepția valorilor înregistrate la pH 5,0 și 7,0.

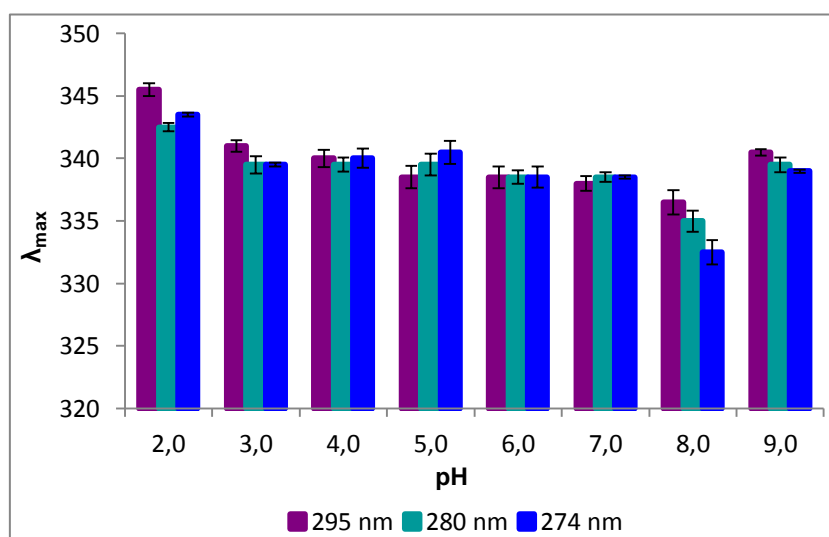


Figura 4.7. Lungimea de undă maximă (λ_{max}) la diferite valori de pH în funcție de lungimea de undă la excitație de 295 nm pentru Trp, 280 nm pentru Trp și Tyr și 274 nm pentru Tyr

Situsuri de legare ANS și hidrofobicitatea suprafeței

După cum se poate observa în figura 4.8, ANS-ul s-a legat de moleculele de tirozinază, fiind monitorizate prin emisia de fluorescență, care a fost redusă la toate valorile de pH studiate, în comparație cu pH 2,0, caz în care, probabil, aproape nici o structură terțiară nu mai există, însă o cantitate mare de structură secundară este prezentă.

În acest caz, prezența proteinei depliată cu suprafețele hidrofobe expuse, provoacă un *blue-shift* de la lungimea de undă 510 nm, valoare ce corespunde ANS-ului liber, la 485 nm specifică ANS-ului legat de proteine.

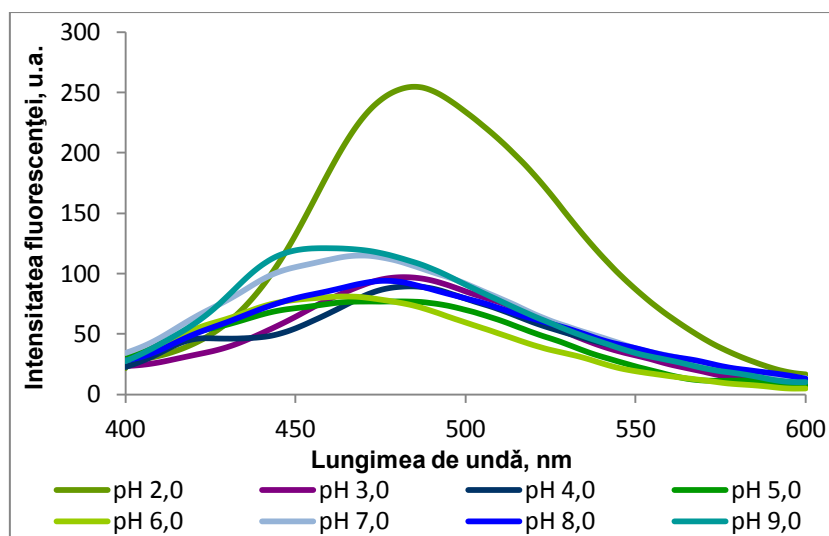


Figura 4.8. Intensitatea fluorescenței tirozinazei în funcție de prezența ANS-ului la diferite valorile de pH

4.1.3.2. Efectul temperaturii asupra modificărilor conformaționale ale tirozinazei

Diagrama de faze

După cum se poate observa, diagramele de fază nu sunt liniare, atât în prezența cât și în absența ionilor de calciu. Dependența neliniară dintre I_{320} și I_{365} , indică prezența mai multor specii structurale distincte, fiind induse prin modificarea caracteristicilor mediului.

Pe baza rezultatelor prezentate în figura 4.13, se poate afirma că la temperatura de 25°C, tirozinaza se găsește sub forma activă de tetramer, generând cea mai mare valoare a intensității fluorescenței, indiferent de lungimea de undă la excitație utilizată.

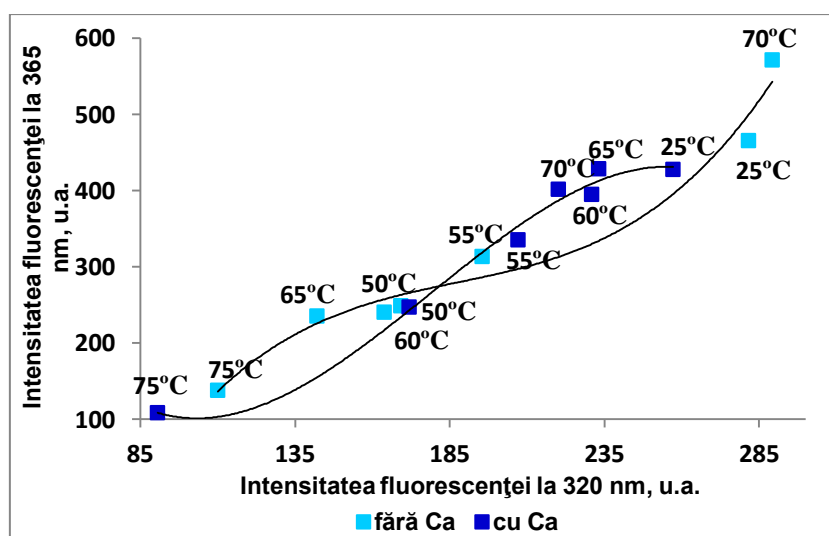


Figura 4.13. Diagrama de fază ce descrie modificările conformaționale ale tirozinazei, induse prin tratamentul termic, bazată pe valorile intensității fluorescenței intrinsecă măsurate la

lungimile de undă 320 și 365 nm. Valorile de temperatură sunt indicate în apropierea simbolului corespunzător

Analiza modificărilor conformaționale induse termic asupra moleculei proteice a tirozinazei

Modelul moleculei tirozinazei a fost echilibrat prin simulări de dinamică moleculară la diferite valori ale temperaturii cuprinse în intervalul 25°C - 70°C, până când deviația standard a energiei potențiale a fost mai mică de 0,1%. Prin creșterea impulsului termic, s-a observat o creștere a valorilor energiei totale pentru structurile echilibrate la temperaturi ridicate (tabelul 4.2).

Rezultatele obținute în urma verificării structurale și conformaționale demonstrează că majoritatea elementelor structurii secundare persistă și la temperaturi înalte. Indiferent de temperatură, structura secundară este dominată de modele α -helix (26,5–29,0%), acestea fiind localizate, în principal, la interfața cu solventul. Structura tirozinazei păstrează un număr considerabil de helixuri, chiar și la temperaturi de peste 60°C. Descreșterea conținutul de α -helixuri este acompaniată de creșterea conținutului de helixuri 3-10 (tabelul 4.2). Cele mai importante modificări au fost semnalate la nivelul subunității H, care a fost indicată ca fiind responsabilă pentru activitatea enzimatică. Consecința modificărilor conformaționale ale tirozinazei, este dinamica interacțiunilor helix–helix, indicând o structură mai puțin compactă la temperaturi ridicate. Creșterea temperaturii de la 25°C la 60°C a determinat reducerea numărului perechilor de helixuri ce interacționează de la 143 la 117.

Spectre de emisie

Din figura 4.15 se observă că intensitatea maximă a fost înregistrată la temperatura de 25°C, în timp ce la temperatura de 65°C s-a obținut cea mai scăzută valoare a intensității fluorescenței pentru ambele resturi de aminoacizi (Trp și Tyr), aceasta fiind cu 79% mai mică, comparativ cu valoarea obținută la temperatura de 25°C.

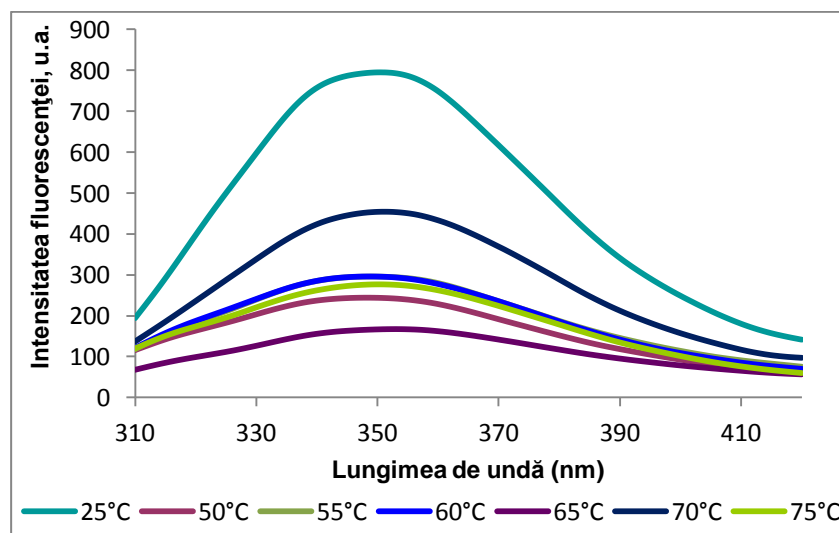


Figura 4.15. Spectrele de emisie obținute la lungimea de undă la excitație de 280 nm în funcție de diferite valori ale temperaturii

Situsurile de legare ale ANS-ului

Experimentele de legare a ANS-ului, monitorizate prin emisia de fluorescență, au indicat modificări semnificative în cazul creșterii temperaturii, atât în prezența, cât și, respectiv, în absența CaCl₂ (figura 4.18).

Nivelul maxim al intensității fluorescenței a tirozinazei în funcție de ANS a fost obținut la temperatura de 65°C, fiind cu aproximativ 16% și, respectiv, 9% mai ridicat comparativ cu valorile măsurate la temperatura de 25°C, după poate observa în figura 4.18. De asemenea, se poate observa un grad maxim de blocare a resturilor hidrofobe care se înregistrează la temperatura de 55°C.

Aceste rezultate indică faptul că prin creșterea temperaturii se induc modificări semnificative în structura terțiară a tirozinazei.

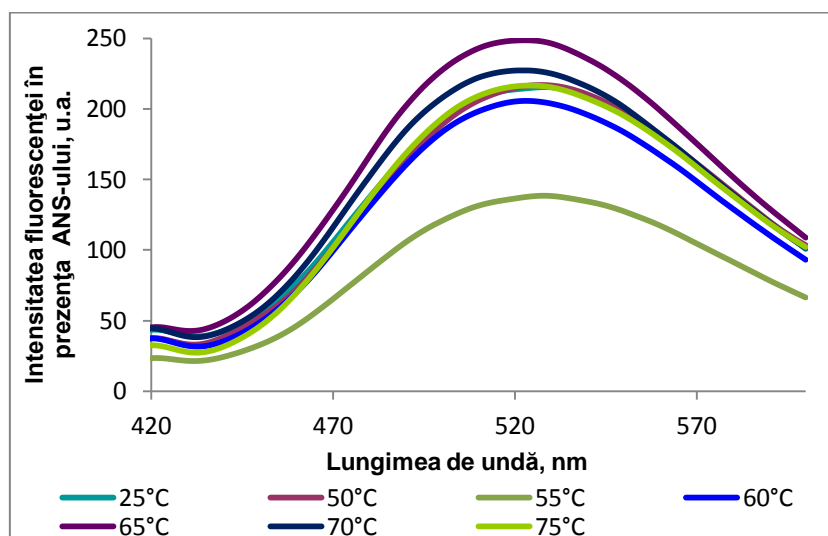


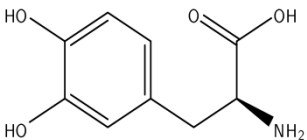
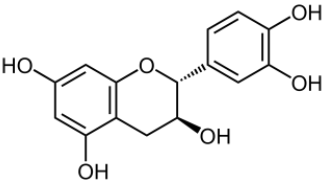
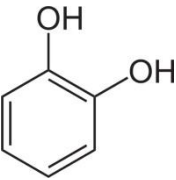
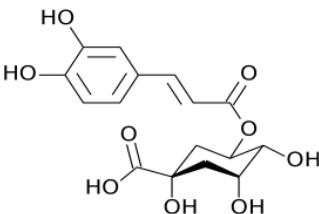
Figura 4.18. Intensitatea fluorescenței tirozinazei în prezența ANS-ului la diferite valori de temperatură

4.1.3.3. Specificitatea de substrat și inhibiția tirozinazei

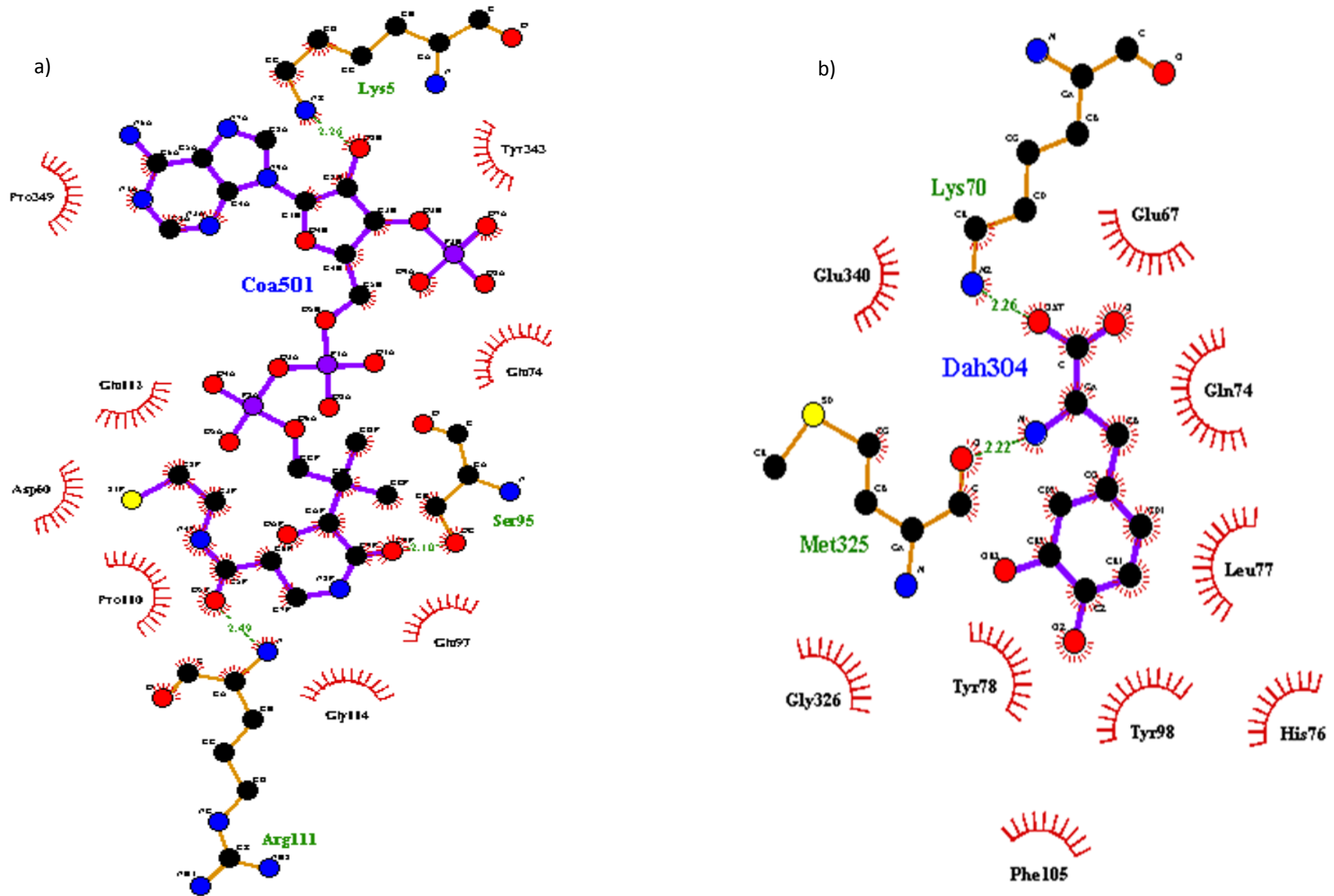
În figura 4.22 sunt prezentate detalii atomice cu privire la interacțiunile stabilite între enzimă și substraturile analizate. Valorile medii ale lungimii legăturilor de hidrogen stabilite între enzimă și substrat au variat în intervalul 2,22-2,89 Å. Liganzii selectați formează legături de hidrogen în mod frecvent cu resturile de Lys⁷⁰ și Lys⁵. Catecholul formează o singură legătură cu Asn²⁴³, acidul clorogenic formează trei legături de hidrogen cu Arg¹¹¹, Lys⁵, Ser⁹⁵, L-DOPA formează două legături cu resturile de aminoacizi Lys⁷⁰ și Met³²⁵, în timp ce catechinea formează patru legături de hidrogen cu Lys⁷⁰, Ala⁷¹, Gln⁷² și Lys⁵.

Pentru comparație, energiile obținute în urma experimentelor de docking sunt prezentate în tabelul 4.4. Enzima prezintă cea mai mare afinitate pentru acidul clorogenic, catechină și L-DOPA, și cea mai redusă afinitate pentru catechol, energiile de legare fiind -42,41 kcal/mol, -39,72 kcal/mol, -30,22 kcal/mol și, respectiv, -16 kcal/mol.

Tabelul 4.4. Interacțiunea predicționată dintre compușii utilizați ca substrat și tirozinază

Substrat	Structură	Energia de legare (kcal/mol)	Energia van der Waals de atracție (kcal/mol)	Energia van der Waals de respingere (kcal/mol)	Nr. legături de H	Resturile de AA în leg. de H
L-DOPA (Dah304)		-30,22	-12,73	2,27	2	Lys ⁷⁰ Met ³²⁵
Catechina (Kxn160)		-39,72	-18,99	6,01	4	Lys ⁷⁰ Ala ⁷¹ Gln ⁷² Lys ⁵
Catechol (Caq503)		-16,00	-7,57	2,33	1	Asn ²⁴³
Acidul clorogenic (Coa501)		-42,41	-20,29	4,94	3	Arg ¹¹¹ Lys ⁵ Ser ⁹⁵

AA – aminoacizi



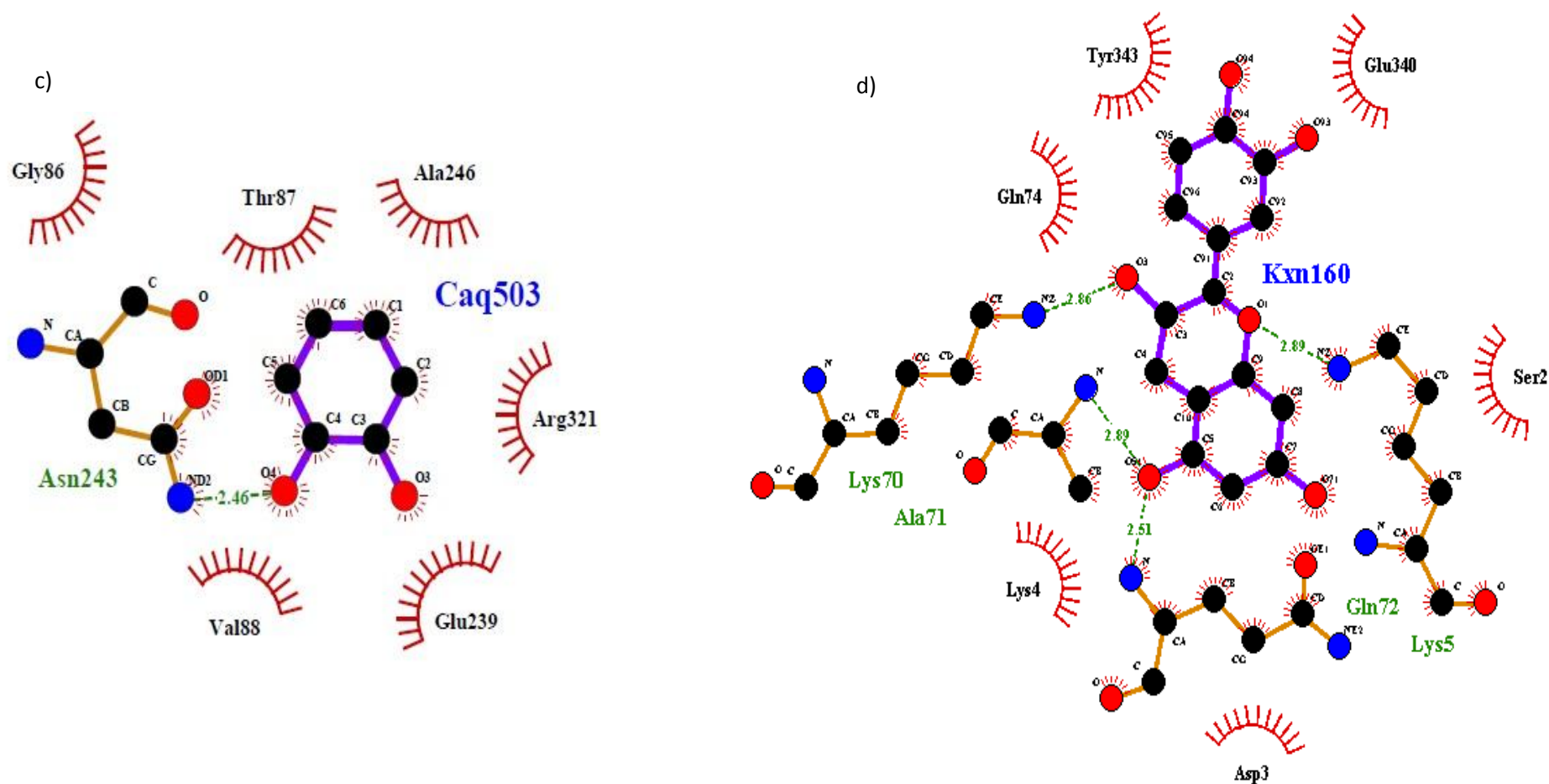


Figura 4.22. Siturile de legare din structura tirozinazei din *Agaricus bisporus* implicate în interacțiunea cu următoarele substraturi: acid clorogenic (a), L-DOPA (b), catechol (c) și catechină (d). Aminoacizii (sau atomi ai acestora) implicați în interacțiuni de tip hidrofob sunt marcați prin arcuri de cerc, de culoare roșie, prevăzute cu raze orientate în direcția atomilor din structura substratului cu care interacționează, iar legăturile de H sunt reprezentate cu linie punctată verde

4.1.3.4. Cinetica de inactivare a tirozinazei

Inactivarea termică a tirozinazei utilizând ca soluție tampon fosfat (pH 7,0) a fost examinată în domeniul de temperatură 50°C-65°C. După cum se poate observa în figura 4.24, tratamentul termic a produs o reducere graduală a activității tirozinazei ce a fost descrisă prin utilizarea unui model cinetic bifazic cu o fracțiune stabilă la temperatură și o fracțiune labilă. Rezultatele obținute indică faptul că activitatea tirozinazei scade odată cu creșterea temperaturii. Activitatea enzimatică a tirozinazei a fost determinată din 10 în 10 minute în urma tratamentului termic la temperaturi diferite, iar activitatea relativă a scăzut cu mai mult de 99% la temperatura de 50°C la aproximativ 5% la temperatura de 65°C.

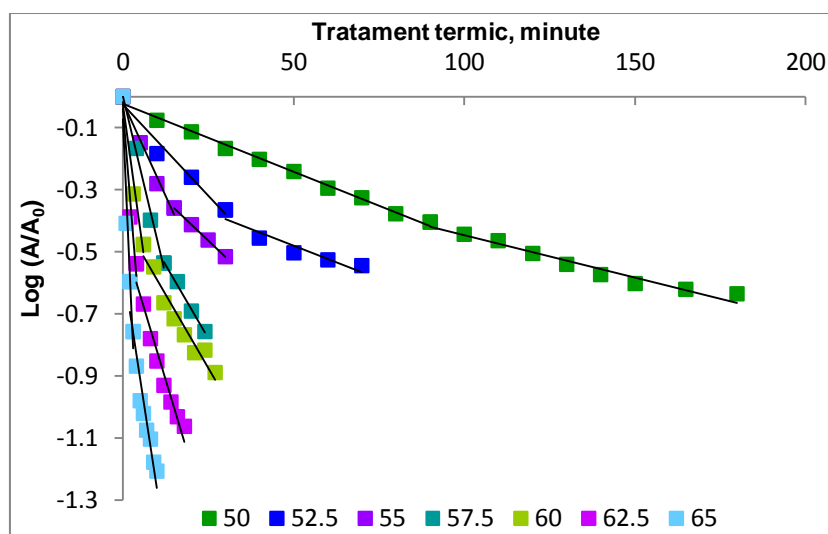


Figura 4.24. Cinetica de inactivare a tirozinazei

4.2. Studiul comportamentului biochimic și molecular al peroxidazei comerciale (*Armoracia rusticana*)

4.2.1. Introducere

Peroxidaza extrasă din *Armoracia rusticana* face parte din clasa enzimelor ce prezintă gruparea hem și care utilizează peroxidul de hidrogen pentru a oxida o varietate mare de compuși, inducând îmbrunarea enzimatică, ceea ce conduce la deteriorarea produselor vegetale.

Prin cercetările efectuate în ultimii ani au fost identificate structurile tridimensionale ale enzimei, ale intermediarilor săi catalitici și mecanismele de cataliză ce prezintă o importanță deosebită în biotehnologie prin utilizarea unor tehnici de mutagenză direcționată pe situsul catalitic, aceste tehnici fiind utilizate în mod curent pentru a investiga structura și funcția POD din hrean și oferind totodată posibilitatea de a identifica noi surse de enzime ce prezintă aplicații practice în sinteza produselor chimice fine, diagnosticarea medicală și bioremediere. Rolurile fiziologice asociate POD din hrean includ metabolismul acidului indol-3-acetic, reacție utilizată în terapiile anticancer, reticularea polimerilor biologici și lignificarea.

Studiile au vizat monitoriza modificările structurale și conformaționale ale enzimei comerciale extrase din *Armoracia rusticana* prin analiză spectrofluorimetrică și tehnici de analiză *in silico*.

4.2.2. Materiale și metode

Peroxidaza extrasă din *Armoracia rusticana*, fosfatul monosodic, fosfatul disodic, 1-anilino-8-naftalinsulfonatul (ANS), iodura de potasiu, acrilamida au fost achiziționate de la Sigma (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO). Enzima a fost utilizată ca atare, fără alte etape de purificare. Toți reactivii au avut puritate analitică.

Etapele de investigare sunt similare cu cele prezentate la subpunctul 4.1.2.

4.2.3. Rezultate și discuții

4.2.3.1. Influența pH-ului asupra comportamentului molecular și cinetic al peroxidazei

Diagrama de fază

În ceea ce privește diagrama de fază, s-a observat o dependență liniară I_{320} versus I_{365} prin modificarea valorilor de pH (figura 4.27), indicând un proces de tranziție *all or none*. Datorită prezenței în număr foarte mare a resturilor de aminoacizi ionizabili în structura POD (din numărul total de aminoacizi, 23,2% sunt ionizabili), s-a demonstrat că o modificare a valorii pH-ului poate modifica încărcarea electrică a proteinei. pH-ul acid a indus modificări conformaționale importante asociate cu distrugerea unor legături de hidrogen și a interacțiunilor hidrofobe.

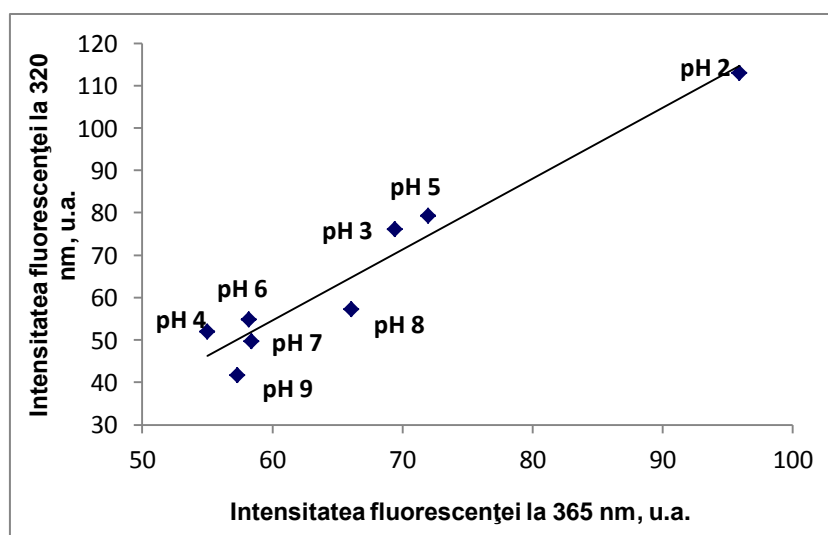


Figura 4.27. Diagrama de fază ce descrie modificările conformaționale ale peroxidazei, induse de un pH diferit, bazată pe valorile intensității fluorescenței intrinsece măsurate la lungimile de undă 320 și 365 nm

Spectre de emisie

Prin studiul modificărilor structurale ale enzimei în funcție de pH s-au obținut diferențe semnificative în funcție de intervalul de pH abordat, astfel cea mai mare intensitate a fluorescenței intrinseci a fost înregistrată la pH 2,0 iar cea mai mică valoare a corespuns cu valoarea de pH 4,0. Valorile obținute pentru intensitatea fluorescenței atestă gradul de expunere cel mai mare al resturilor hidrofobe (Trp și Tyr), respectiv, cel mai mare și cel mai mic.

Se poate observa din figura 4.29 că intensitatea maximă a fluorescenței a fost înregistrată la valoarea de pH 2,0, în timp ce valoarea cea mai mică a fost înregistrată la pH 4,0.

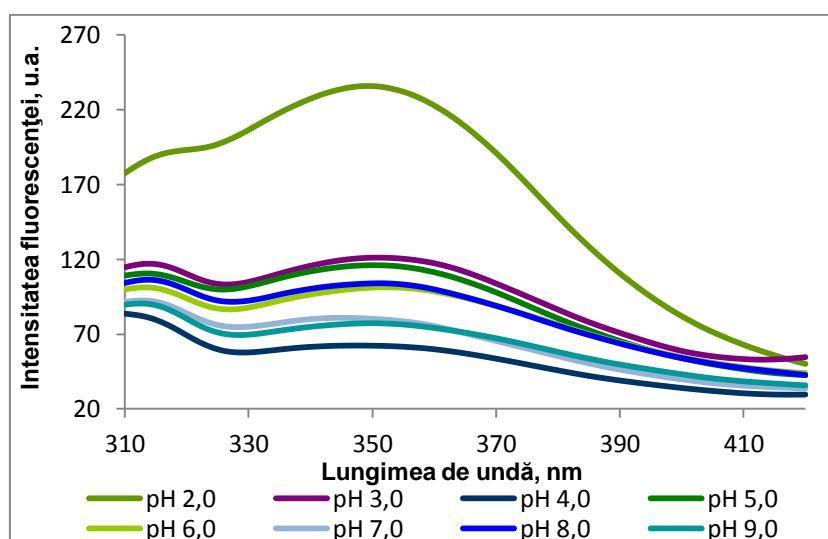


Figura 4.29. Spectrele de emisie obținute la lungimea de undă la excitație de 280 nm în funcție de diferite valori ale pH-ului

Valoarea maximă a intensității fluorescenței la lungimea de undă la excitație de 280 nm, a fost de 349,5 nm, aceasta fiind înregistrată la pH 2,0, iar creșterea valorii pH-ului a cauzat un *blue-shift* de 37 nm a valorii λ_{max} , comparativ cu valoarea de la pH 9,0. Soluțiile de POD au arătat un λ_{max} de 352 nm la pH 6,0. Scăderea pH-ului a cauzat un *blue-shift* de 4,5 nm la pH 4,0 și de 3 nm la pH 2,0. Valoarea maximă a unui *blue-shift* a fost înregistrată la pH 7,0 (8,5 nm), urmată de un *red-shift* de 8,5 nm și 5,5 nm la pH 8,0 și, respectiv, pH 9,0.

În ceea ce privește lungimea de undă la excitație de 274 nm, valoarea maximă s-a obținut, de asemenea, la pH 2,0, aceasta fiind de 349 nm. Creșterea pH-ului a generat un *blue-shift* de 39 nm, la pH 9,0. În domeniul de pH acid, moleculele parcurg un proces de depliere, cauzând expunerea resturilor hidrofobe în mediu apos, în timp ce la pH neutru și alcalin, proteina trece printr-un proces de pliere.

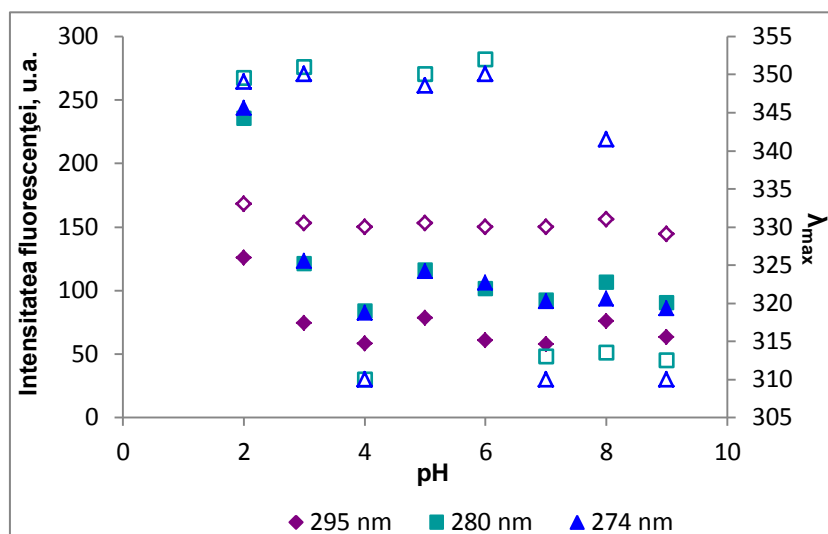


Figura 4.31. Modificările structurale ale peroxidazei monitorizate prin intermediul intensității fluorescenței (FI) (simboluri pline) și λ_{max} (simboluri goale) la diferite valori de pH. Lungimea de undă la excitație a fost de 295 nm (romburi), 280 nm (triunghiuri) și 274 nm (pătrate) iar emisia a fost colectată între 300 și 420 nm

4.2.3.2. Efectul temperaturii asupra comportamentului peroxidazei

Diagrama de faze

Tratamentul termic în domeniul de temperatură 25°C - 80°C (figura 4.34) a condus la obținerea unui *model two state*, caracterizat de o corelație liniară ce indică prezența a două specii moleculare distincte. Până la temperatura de 50°C predomină forma nativă a enzimei în stare de pliere, ceea ce conduce la o expunere redusă a resturilor hidrofobe. La temperaturi mai ridicate, are loc procesul de oligomerizare a formei native, fapt certificat de reducerea intensității fluorescenței.

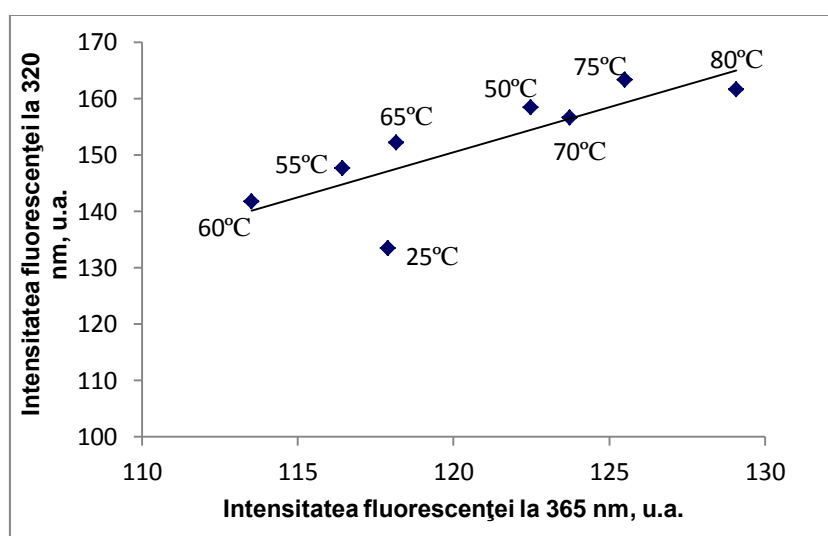


Figura 4.34. Diagrama de fază ce descrie modificările conformaționale ale peroxidazei, induse prin tratamentul termic, bazată pe valorile intensității fluorescenței intrinseci măsurate la lungimile de undă 320 și 365 nm

Tratamentul termic la temperaturi între 70-80°C, a indus modificări conformaționale, acestea fiind asociate cu distrugerea unor legături care stabilizează conformația proteinei enzimatică. Se poate concluziona că, în aceste condiții, formele oligomerice disociază, iar valorile intensității fluorescenței cresc în comparație cu temperatura de 25°C.

Analiza modificărilor conformaționale induse peroxidazei prin tratament termic, la nivelul de moleculă unică

Pentru a înțelege mai bine mecanismul molecular responsabil de stabilitatea la temperatură a POD, s-au utilizat tehnici de analiză *in silico* pentru a estima comportamentul enzimei la nivel de moleculă unică. Formațiunile structurale de tip helix predomină în structura enzimei echilibrată la diferite temperaturi. Se observă totuși o variație a numărului total de α -helixuri precum și interacțiunile dintre ele variază în funcție de temperatură. Deși, după tratamentul la temperatura de 80°C un număr mare de aminoacizi (58,2%) nu a fost implicat în formațiuni structurale bine definite la nivel secundare, precum helixuri sau foi β -pliate, totuși, structura enzimei este în ansamblu bine păstrată.

Spectre de emisie

Experimentele realizate la diferite temperaturi au demonstrat că intensitatea fluorescenței POD a crescut în procente diferite (8-14%), comparativ cu enzima ce nu a fost supusă tratamentului termic. Intensitatea maximă a fluorescenței a fost observată la temperatura de 25°C. Scăderea secvențială a intensității fluorescenței odată cu creșterea temperaturii indică modificări conformaționale care conduc la o accesibilitate redusă a resturilor hidrofobe.

Din figura 4.36, se observă că în funcție de tratamentul termic, intensitatea maximă a fost înregistrată la temperatura de 80°C, în timp ce valoarea cea mai mică a fost măsurată la temperatura de 55°C. Se pot observa diferențe semnificative între spectrele de emisie.

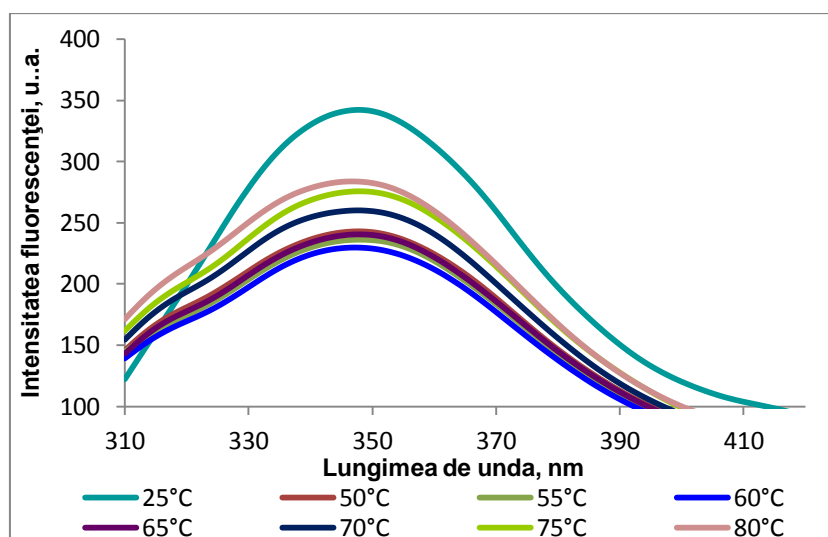
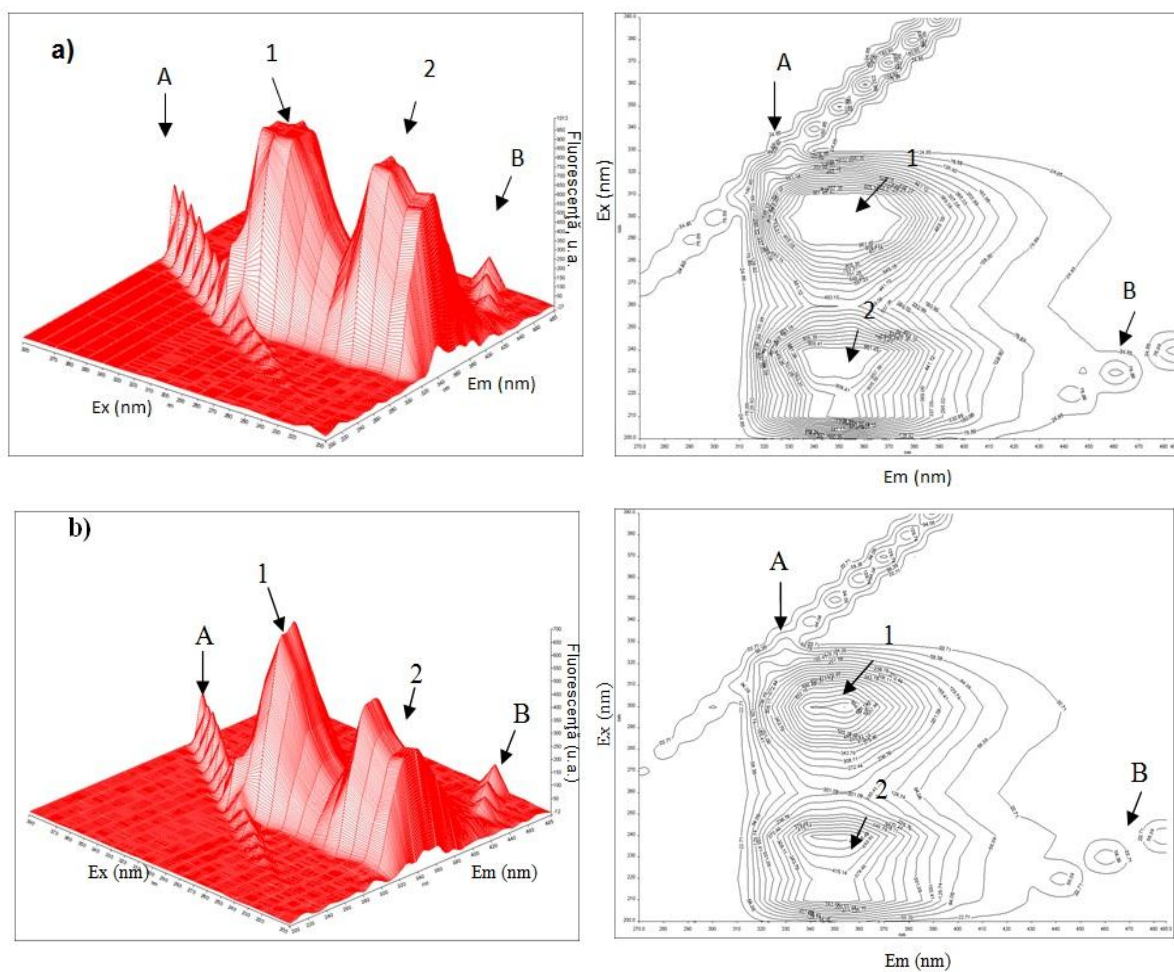


Figura 4.36. Spectrele de emisie obținute la lungimea de undă la excitație de 280 nm în funcție de diferite valori ale temperaturii

Spectroscopie tridimensională de fluorescență

În ultimii ani, pentru a obține informații mai detaliate referitoare la modificările conformaționale ale proteinelor, s-au utilizat spectre tridimensionale ale fluorescenței. Această tehnică se bazează pe evaluarea modificărilor prin considerarea modificării lungimii de undă la excitație sau la emisie în jurul peak-ului fluorescenței și pe prezența sau dispariția peak-urilor. Modificările conformaționale ale POD induse de tratamentul termic au fost investigate prin compararea caracteristicilor spectrale ale stărilor prin care trece proteina nativă și tratată termic. Spectrele tridimensionale ale fluorescenței și hărțile de contur ale soluției de POD tratată la diferite temperaturi sunt prezentate în figura 4.39, iar parametrii ce caracterizează spectrele sunt prezentate în tabelul 4.9. În figura 4.39 se pot observa 4 peak-uri.



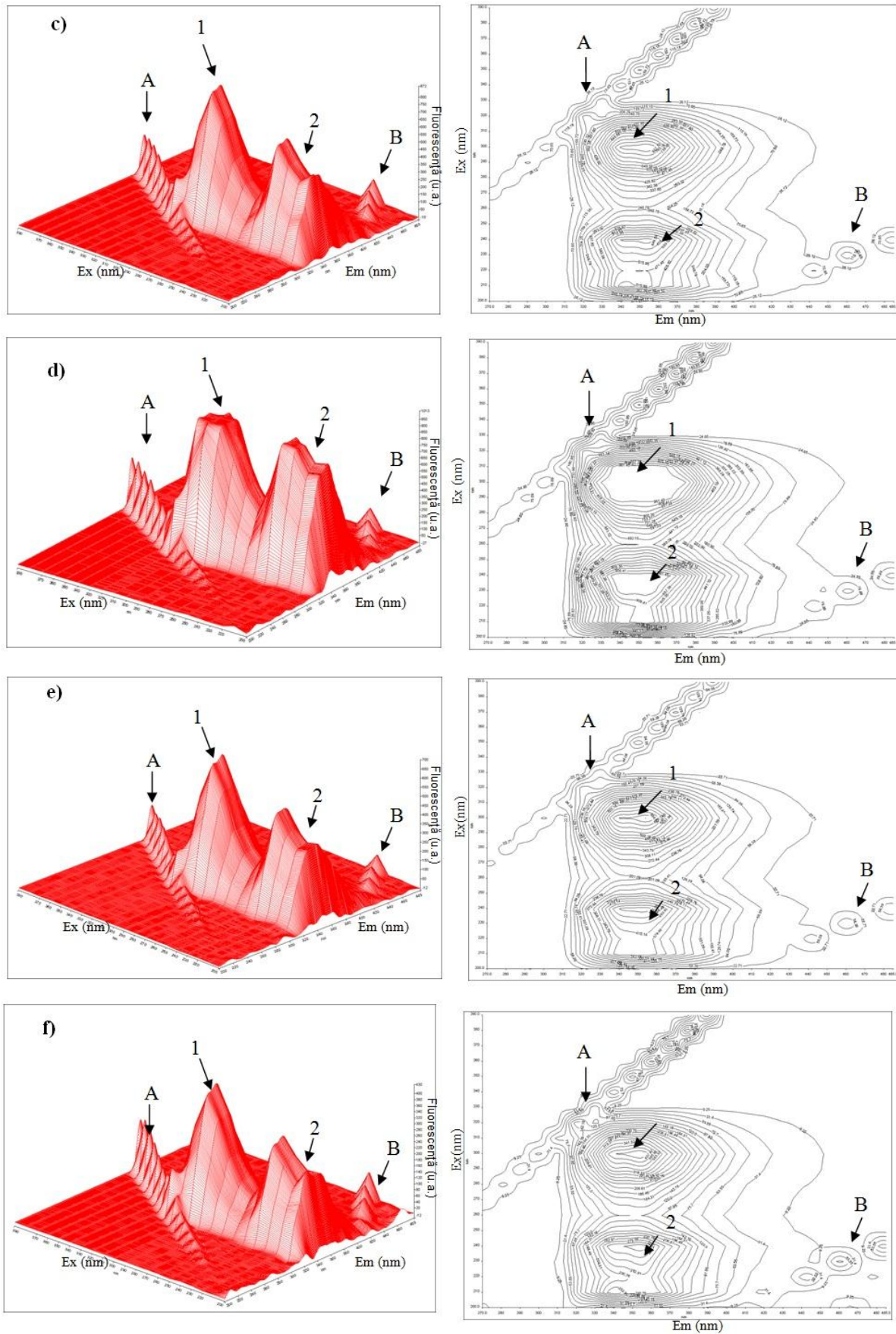


Figura 4.39. Spectrele tridimensionale ale fluorescenței și diagramele de contur ale POD la 25°C (a), 40°C (b), 50°C (c), 60°C (d), 70°C (e) și 80°C (e)

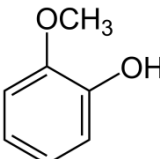
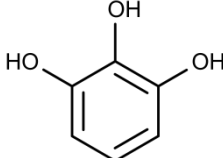
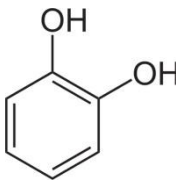
Intensitatea fluorescenței peak-urilor 1 și 2 a crescut semnificativ la temperatura de 60°C, cu toate că la temperatura de 50°C s-a produs o scădere, însă valoarea fiind semnificativ mai mare, prin comparație cu proteina nativă. La temperaturi mai mari de 70°C, a avut loc o scădere semnificativă a intensității fluorescenței, fapt ce explică reorientările semnificative asociate cu pliarea lanțului polipeptidic prin tratamentul termic al soluțiilor de proteină. Valoarea intensității peak-ului 1 și peak-ului 2 a variat în proporție de 1:1,3 la temperatura de 25°C și de 1: 2,0 la temperatura de 70°C. Pentru difuzia luminii de rezonanță a fost identificat un model *chine* (asemănător modelului unei coloane vertebrale) în timp ce pentru hărțile de contur se observă un model de tip *pencil print* (model asemănător unui desen în creion) (figura 4.39). Hărțile de contur au expus o perspectivă de tip *bird's eye view* (perspectiva de a observa de sus) a spectrelor de fluorescență. Hărțile tridimensionale ale fluorescenței soluțiilor de proteină tratate termic au prezentat diferențe semnificative, confirmându-se astfel modificările conformaționale ale proteinei prin modificarea condițiilor de mediu.

4.2.3.3. Evaluarea specificității de substrat și a inhibiției peroxidazei prin andocare moleculară

Tehnica de andocare moleculară a fost utilizată pentru a determina specificitatea de substrat și inhibiția POD din *Armoracia rusticana*. Astfel a fost investigată specificitatea de substrat a enzimei pentru substraturi precum catechol, guaiacol și pirogalol. Valorile obținute au fost în intervalul 2,59-3,24 Å. Liganzii selectați sunt implicați fiecare în câte o legătură de hidrogen. Astfel catecholul formează o singură legătură cu Arg¹¹⁸, guaiacolul formează o legătura de hidrogen cu Asn⁷², în timp ce pirogalolul interacționează cu Ser⁷⁸.

Energiile obținute prin experimente de docking sunt prezentate în tabelul 4.11. În baza valorilor energiei de legare se poate aprecia că enzima prezintă cea mai mare afinitate pentru guaiacol (-30,58 kcal/mol), fiind urmat de pirogalol (-20,72 kcal/mol), și cea mai mică afinitate pentru catechol (-18,38 kcal/mol).

Tabelul 4.11. Interacțiunea predicționată dintre compușii utilizați ca substrat și peroxidază

Substrat	Structură	Energia de legare (kcal/mol)	Energia van der Waals de atracție (kcal/mol)	Energia van der Waals de respingere (kcal/mol)	Nr. legături de H	Resturile de AA în leg. de H
Guaiacol (Jz31296)		-30,58	-15,54	3,37	1	Asn ⁷²
Pirogalol (Pyg504)		-20,72	-8,21	0,56	1	Ser ⁷⁸
Catechol (Caq503)		-18,31	-9,23	0,17	1	Arg ¹¹⁸

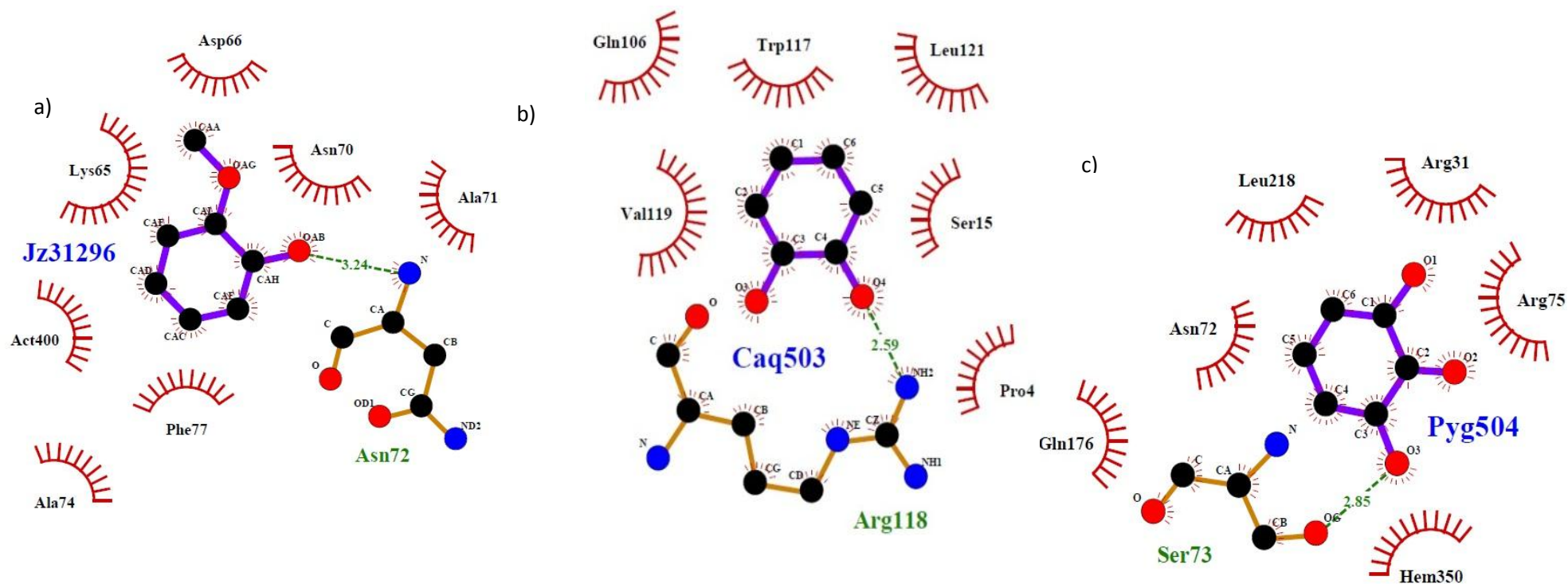


Figura 4.44. Siturile de legare din structura peroxidazei din *Armoracia rusticana* implicate în interacțiunea cu următoarele substraturi: guaiacol (a), catechol (b) și pirogalol (c). Aminoacizii (sau atomi ai acestora) implicați în interacțiuni de tip hidrofob sunt marcați prin arcuri de cerc, de culoare roșie, prevăzute cu raze orientate în direcția atomilor din structura substratului cu care interacționează, iar legăturile de H sunt reprezentate cu linie punctată verde

4.2.3.4. Cinetica de inactivare a peroxidazei

Profilul stabilității termice a POD comerciale a fost realizat prin termostatarea enzimei, timp de 10 minute, la temperaturi cuprinse în intervalul 25°C-70°C. Tratamentul termic a indus o descreștere graduală a activității peroxidazei extrase din *Armoracia rusticana* (figura 4.46). Activitatea relativă a enzimei a scăzut de la 97%, la temperatura de 35°C, la 3%, la temperatura de 60°C. Se poate observa din figura 4.46 că inactivarea termică a POD este descrisă de un model bifazic, care indică prezența unei fracțiuni labile și a unei fracțiuni stabile din punct de vedere termic, ambele fracțiuni având o cinetică de inactivare de ordinul I.

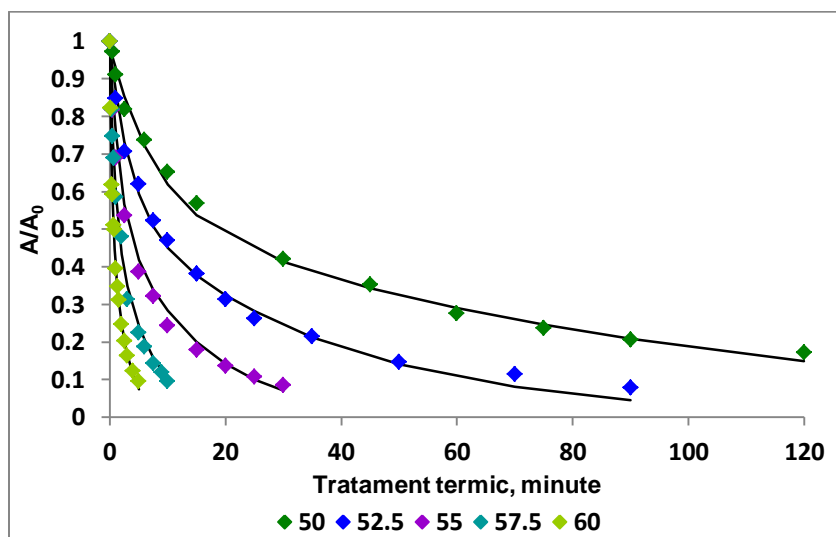


Figura 4.46. Cinetica de inactivare a POD

4.3. Concluzii parțiale

Structura tirozinazei prezintă o conformație mai flexibilă în domeniul de pH acid, favorizând astfel expunerea resturilor hidrofobe, cu un blue-shift al valorii λ_{max} de 9 nm pentru resturile de Trp, atunci când pH-ul crește de la 3,0 la 8,0, urmând apariția unui red-shift mic de 4 nm, atunci când pH-ul a fost ajustat la valoarea 9,0. Odată cu creșterea valorii de pH de la neutru la alcalin, probabil că proteina trece prin mai multe forme structurale intermediare, inclusiv formele de tetramer, trimer și dimer.

Indiferent de prezența ionilor de Ca, diagramele de fază nu au fost liniare, indicând astfel prezența mai multor specii moleculare distincte, acest lucru fiind indus prin modificarea mediului de reacție.

Rezultatele obținute pentru intensitatea fluorescenței indică modificări conformaționale majore prin excitarea la 295 nm, cu apariția unui blue-shift de 16 nm a valorii λ_{max} , valoare obținută prin creșterea temperaturii de la 25 la 50°C, fiind urmată de un red shift de 15 nm prin creșterea

temperaturii la 55°C. O creștere ulterioară a temperaturii de la 60°C la 65°C, a condus la apariția unui blue shift de 14,5 și, respectiv, de 11 nm.

Pentru a descrie inactivarea termică a tirozinazei s-a utilizat un model bifazic, energiile de activare fiind $244,00 \pm 15,11$ kJ/mol pentru fracțiunea labilă și $213,94 \pm 8,37$ kJ/mol pentru fracțiunea stabilă.

Tehnicile de andocare moleculare au fost utilizate pentru a determina specificitatea de substrat a tirozinazei. Astfel, în funcție de energiile de legare enzima a prezentat cea mai mare afinitate pentru acidul clorogenic, valoarea energiei fiind -42,41 kcal/mol, iar cea mai mică afinitate pentru catechol, respectiv, -16 kcal/mol.

Studiile de spectrofluorimetrie au demonstrat că pentru POD comercială (*Armoracia rusticana*) se obțin diagrame de fază liniare, indicând astfel un model de denaturare *two state*, atât în funcție de pH cât și în funcție comportamentul la tratament termic.

Valoarea maximă a intensității fluorescenței la pH-ul optim s-a înregistrat la lungimea de undă de 352 nm, indicând faptul că resturile de Trp din catena laterală sunt, oarecum, neaccesibile moleculelor de apă, deși nu sunt localizate în regiunea hidrofobă a proteinei.

Pentru a descrie inactivarea termică a peroxidazei, s-a utilizat un model cinetic bifazic. Valorile obținute pentru energia de activare au fost $283,00 \pm 67,38$ kJ·mol⁻¹ pentru fracțiunea labilă și $324,56 \pm 77,28$ kJ·mol⁻¹ pentru fracțiunea stabilă.

Rezultatele modelării moleculare ce au fost realizate pentru a simula comportamentul POD la diferite temperaturi (de la 25°C la 80°C) confirmă existența unui intermediar de tip *pre-molten globule* format la temperaturi mai mari de 50°C, acesta fiind caracterizat printr-o structură secundară stabilă, însă având structura terțiară din apropierea situsului hem activ extrem de modificată.

Prin utilizarea tehnicilor de andocare moleculară a fost determinată specificitatea de substrat a POD extrase din hrean, astfel în funcție de energiile de interacțiune enzima a prezentat cea mai mare afinitate pentru guaiacol, cu o energie de -30,58 kcal/mol, iar cea mai mică afinitate pentru catechol, respectiv, -18,38 kcal/mol.

Rezultatele obținute pot contribui la o mai bună înțelegere a comportamentului enzimelor în sisteme model. Modificările conformaționale ale moleculelor de tirozinază și peroxidază, survenite în urma tratamentului termic și modificării pH-ului, pot conduce spre o mai bună înțelegere a relației structură-funcție și în ceea ce privește obținerea de produse cu funcționalitatea dorită.

5. Caracterizarea proprietăților catalitice ale enzimelor oxidative extrase din prune (*Prunus domestica*)

În România, prunele sunt comercializate sub diferite forme respectiv sub formă de fructe proaspete, fructe uscate, gemuri, piureuri, sucuri naturale, compoturi etc. Studiile întreprinse pe diferite varietăți au relevat concentrații diferite de compuși biologic activi.

Studiile prezentate în acest capitol descriu proprietăți catalitice și comportamentale ale enzimelor polifenoloxidază (PFO) și peroxidază (POD), enzime oxidative, cu impact în procesul de îmbrunare enzimatică, extrase din prunele românești (*Prunus domestica*), utilizând tehnici moderne de investigare biochimică pentru identificarea condițiilor optime de activitate, precum și pentru identificarea condițiilor fizico-chimice de inactivare a acestora în timpul procesării, după cum urmează:

- extracția și purificarea parțială a enzimelor;
- purificarea prin precipitare cu sulfat de amoniu și cromatografie și verificarea purității prin electroforeză în gel de poliacriamidă;
- evaluarea proprietăților catalitice și a condițiilor de inactivare.

Rezultatele obținute sunt importante și prezintă valoare științifică din punct de vedere aplicativ, economic și industrial deoarece oferă numeroase informații asupra comportamentului celor două enzime în diferite condiții de procesare termică sau la presiune înaltă, având un impact deosebit în industria alimentară și biotehnologie.

5.1. Caracterizarea polifenoloxidazei din prune

5.1.1. Introducere

Importanța PFO în reacțiile de îmbrunare enzimatică continuă să fie în atenția multor cercetători, astfel încât foarte multe publicații descriu reacții de îmbrunare prezente într-o varietate de țesuturi (Mayer, 2006). Îmbrunarea enzimatică reprezintă una dintre problemele majore care contribuie la pierderea calității fructelor și legumelor. Apariția îmbrunării enzimatice se datorează acțiunii PFO asupra compușilor fenolici, care sunt prezenți în mod natural, în plante (Zawistowski și colab., 1991). Inactivarea PFO este necesară pentru a minimaliza pierderile de producție cauzate de îmbrunarea enzimatică. În acest sens, mai multe tehnologii și metode au fost studiate. În acest context, s-au analizat proprietățile catalitice ale PFO extrase din prune (*Prunus domestica*) sub aspectul funcționalității optime și a stabilității la temperatură, pH și presiune înaltă cât și în prezența compușilor inhibitori.

5.1.2. Materiale și metode

Prune autohtone din specia *Prunus domestica*, originare din România, au fost achiziționate de la piața locală, din Galați. Reactivii pentru analize, achiziționați de la firma Sigma Aldrich, Germania, au prezentat grade de puritate analitică ridicată și au fost utilizați ca atare.

Aparatura de laborator utilizată pentru realizarea experimentelor a fost: spectrofotometru GBC UV-Vis Cintra 202, GBC, Melbourne, Australia, centrifugă Hettich Universal 320 R, Germania, echipament cromatografie FPLC ÄKTA pure 25, GE Healthcare (Uppsala, Sweden), baie de apă cu răcire Julabo F33 MC, Spania, echipament de electroforeză în gel Mini-PROTEAN Tetra, Bio-Rad (California, S.U.A.), instalație de presiune înaltă Resato FPU 100-2000 (Resato, Roden, Olanda).

Investigațiile realizate în acest capitol au urmărit:

- Determinarea activității enzimaticice
- Determinarea conținutului de proteine prin metoda Bradford
- Purificarea enzimei prin precipitarea cu sulfat de amoniu și tehnici de cromatografie
- Evidențierea polifenoloxidazei prin electroforeză în gel și determinarea masei moleculare
- Evaluarea proprietăților catalitice și a stabilității:
 - Influența concentrației enzimei
 - Specificitatea de substrat și influența concentrației substratului
 - Efectul pH-ului asupra polifenoloxidazei (pH-ul optim de acțiune și stabilitatea la pH)
 - Efectul temperaturii asupra polifenoloxidazei (temperatura optimă și termostabilitatea)
 - Influența inhibitorilor
 - Stabilitatea la presiune înaltă a polifenoloxidazei.

5.1.3. Rezultate și discuții

5.1.3.1. Extracția și purificarea parțială a polifenoloxidazei din prune

S-a analizat gradul de purificare al extractului enzimatic după precipitare parțială cu sulfat de amoniu, prin cromatografie prin interacțiuni hidrofobe și cromatografie prin schimb ionic. Astfel, se poate observa în figura 5.5, profilul de eluare a extractului parțial purificat prin precipitare cu sulfat de amoniu aplicat pe coloana HiPrep Phenyl FF 16/10 (cromatografie prin interacțiuni hidrofobe). Sunt evidențiate două peak-uri prin eluarea în gradient liniar cu soluție 20 mM tampon fosfat (pH 7,0).

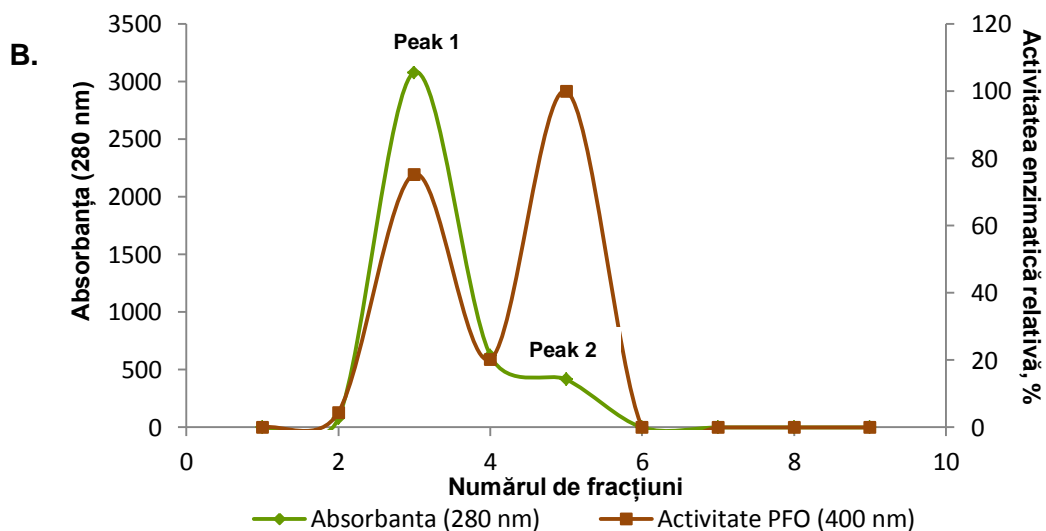


Figura 5.5. Profilul de eluare a extractului parțial purificat în urma precipitării cu sulfat de amoniu prin coloana HiPrep Phenyl FF 16/10 (cromatografie prin interacțiuni hidrofobe) în funcție de absorbanta la 280 nm, conductivitate (A) și activitatea enzimatică relativă a PFO (B)

Se poate observa în figura 5.6, profilul de eluare a fracțiunii active colectată de pe coloana HiPrep Phenyl FF 16/10 (cromatografie prin interacțiuni hidrofobe) aplicată pe coloana Mono Q 5/50 GL (cromatografie prin schimb ionic). Prin eluarea în gradient vertical (0-100%) cu o soluție 20 mM tampon fosfat și NaCl 1,0 M (pH 7,0), s-a obținut un singur peak, bine definit (figura 5.6).

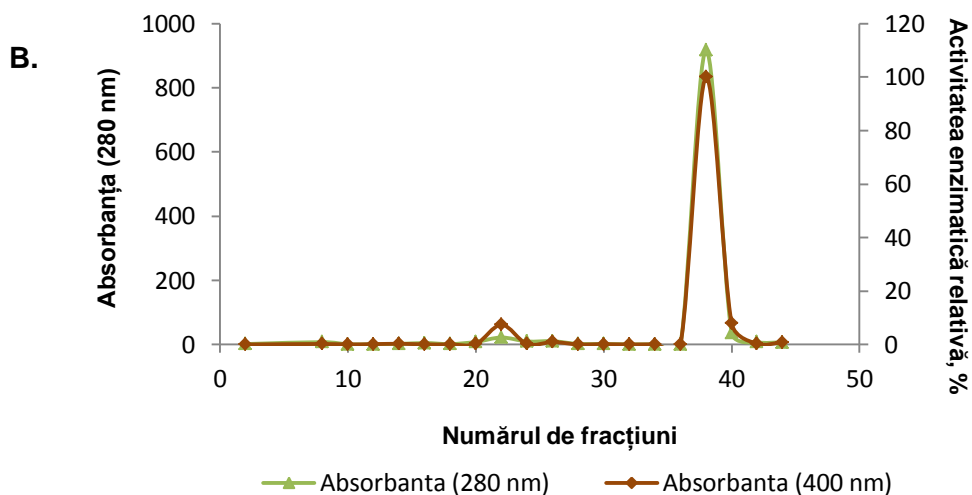


Figura 5.6. Profilul de eluare a fracțiunii active colectată de pe coloana HiPrep Phenyl FF 16/10 (cromatografie prin interacțiuni hidrofobe) aplicată pe coloana Mono Q 5/50 GL (cromatografie prin schimb ionic) în funcție de absorbanta la 280 nm și activitatea enzimatică relativă a PFO (B)

În urma etapei de purificare prin cromatografie prin interacțiuni hidrofobe (HIC), factorul de purificare pentru peak-ul I (10,3), cu o activitate specifică de 1574199 unități/mg, prezintă o valoare destul de apropiată față de factorul de purificare obținut pentru peak-ul II (12,99). Conform ultimei etape de purificare prin cromatografie prin schimb ionic, fracțiunea conține o cantitate foarte mică de proteine, 0,175 mg iar activitatea enzimatică specifică este de 5012142 unități/mg. Această valoare a activității corespunde unui factor de purificare de 32,81, cu un grad de recuperare a enzimei de 3,04%.

Tabelul 5.4. Gradul de purificare al PFO și determinarea conținutului de proteine prin metoda Bradford

Fracțiunea	Volum (mL)	Proteine (mg/mL)	Proteine totale (mg)	Activitate enzimatică totală	Activitate specifică (unități/mg)	Grad purificare	Grad recuperare (%)
Extract brut	700	2,031	1421,7	217133545	152728	1	100
Precipitare cu 30-90% (NH ₄) ₂ SO ₄	100	1,134	113,4	60797668	536135	3,51	28,48
HIC peak I	7	0,139	0,973	1531696	1574199	10,3	9,7
HIC peak II	5	0,027	0,135	267919	1984586	12,99	7,69
Mono Q	7	0,025	0,175	877125	5012142	32,81	3,04

5.1.3.2. Estimarea masei moleculare a polifenoloxidazei din prune

Pentru fracțiunile obținute în urma purificării prin cromatografie prin interacțiuni hidrofobe (liniile 2 și 6) și cromatografie prin schimb ionic (liniile 3 și 7), s-a observat prezența a două benzi adiacente, de concentrație diferită, aspect marcat prin intensitatea celor două benzi. Activitatea enzimatică a fracțiunilor purificate, testată pe diferite tipuri de substrat specific enzimelor oxidative, a evidențiat prezența a două enzime, PFO și POD, rezultat ce a fost corelat cu cele două benzi proteice separate prin electroforeză în gel denaturant de poli(acrilamidă). În conformitate cu valoarea activităților enzimatică specifice determinate și cu diferitele conținuturi de PFO și POD, s-a estimat faptul că, prima bandă corespunde PFO, în timp ce a doua bandă proteică corespunde POD. Pentru identificarea celor două enzime s-a realizat incubarea gelului obținut după migrarea extractului parțial purificat prin precipitare cu sulfat de amoniu în condiții nedenedurante, cu soluții de substrat specifice, și anume, catechol pentru PFO și guaiacol cu peroxid de hidrogen, pentru POD. Developarea în gel a benzilor specifice fiecărei enzime în urma reacției enzimă - substrat a permis deducerea faptului că PFO are o masă moleculară mai mare decât a POD (figura 5.7 - linia 8 și figura 5.22 – linia 8).

Masa moleculară a PFO extrasă din prune fost calculată în funcție de rata relativă de migrare (Rf) a acesteia în gelul SDS-PAGE, pe baza ecuației de regresie cu $R^2 = 0,9934$. Astfel, s-a estimat masa moleculară a PFO la aproximativ 65 kDa.

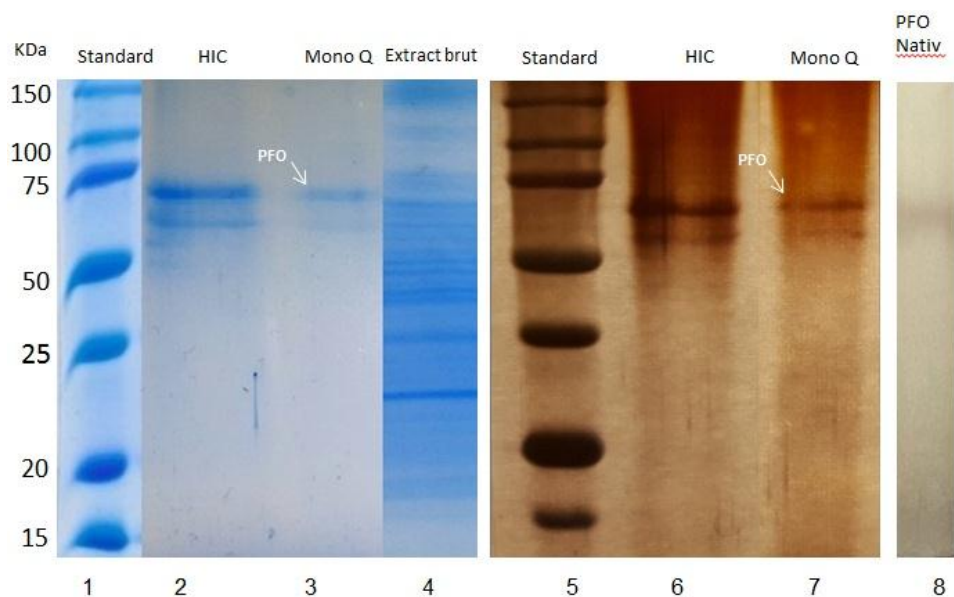


Figura 5.7. Electroforeza în gel a extractului brut și a fracțiunilor ce au prezentat activitate enzimatică pentru PFO. Liniile 1-4 (SDS-PAGE, colorare cu albastru brillant de Coomassie G-250; liniile 5-8 (SDS-PAGE, colorare cu nitrat de argint). Liniile 1 și 5 - Marker molecular Precision Plus Protein Dual Xtra; Liniile 2 și 6 – extract purificat pe HiPrep Phenyl FF 16/10; Liniile 3 și 7 – extract purificat pe Mono Q 5/50 GL; Linia 4 – Extract (precipitare cu sulfat de amoniu 30-90%); Linia 8 (Native –PAGE) – extract (precipitare cu sulfat de amoniu 30-90%).

5.1.3.5. Influența pH-ului asupra polifenoloxidazei din prune

Stabilitatea la pH a polifenoloxidazei

Stabilitatea PFO extrase din prunele *Prunus domestica* a fost evaluată pe parcursul a trei zile. Enzima a fost termostată la valori de pH cuprinse între 4,0-8,0 (figura 5.9). Astfel, se observă că cea mai mare valoare a activității enzimatice relative a fost obținută pentru valoarea de pH 6,0 aceasta fiind în concordanță cu valoarea obținută la determinarea pH-ului optim de activitate. La valorile de pH 4,0; 4,5 și 5,0 PFO își menține 61%, 67% și respectiv 62% din activitatea enzimatică inițială, după 48 h de tratament.

Enzima prezintă stabilitatea în domeniul de pH acid, menținându-și peste 60% din activitatea enzimatică, în timp ce, în domeniul de pH alcalin, PFO din *Prunus domestica* își menține doar 28% din activitatea enzimatică maximă.

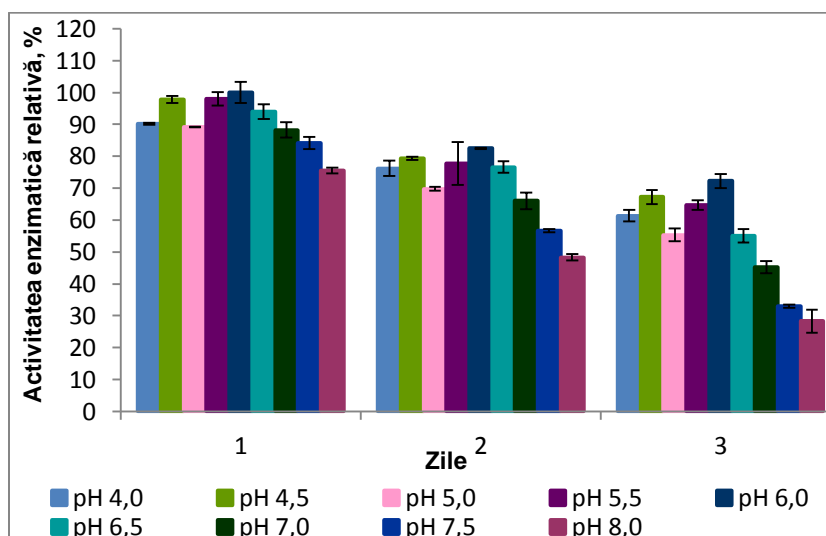


Figura 5.13. Stabilitatea la pH a PFO din prune

5.1.3.6. Efectul temperaturii asupra polifenoloxidazei din prune

Stabilitatea la temperatură a polifenoloxidazei

Pentru a determina stabilitatea la temperatură a PFO extrase din *Prunus domestica*, extractul enzimatic parțial purificat a fost termostatat la temperaturi cuprinse între 25-85°C, pentru perioade de timp de 10, 15 și 20 minute, utilizând ca substrat o soluție de catechol 0,03M, la pH 6,0. Rezultatele obținute au demonstrat că valoarea maximă a activității enzimatice a fost obținută la temperatura de 25°C. La temperatura de 60°C, după 20 minute de expunere, enzima își menține 70% din activitatea maximă, iar la temperatura de 65°C, enzima își menține un procent de 69%.

În ceea ce privește stabilitatea PFO extrasă din prune, aceasta prezintă o stabilitate mai ridicată în intervalul de temperaturi situat între 55°C-65°C, în timp ce, în intervalul 70-85°C, activitatea enzimatică scade brusc ca urmare a unui proces de inactivare termică.

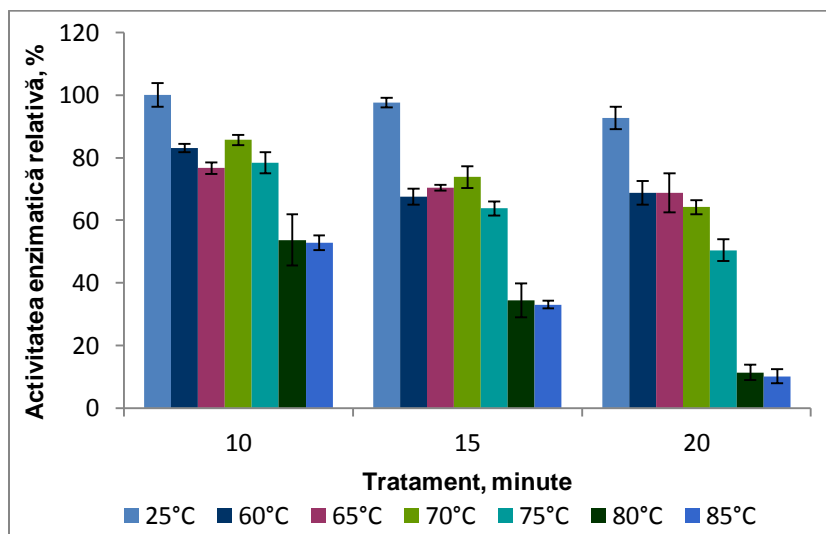


Figura 5.15. Stabilitatea la temperatură a PFO din prune

Inactivarea termică a polifenoloxidazei

Studiul inactivării termice a PFO extrasă din *Prunus domestica* s-a realizat în intervalul de temperatură 60-85°C, timp de 10-90 minute.

În figura 5.16 se observă că inactivarea termică a PFO extrase din prune este descrisă de un model cinetic de ordinul I în domeniul de temperatură studiat. Procesul de inactivare a acestei enzime începe cu temperatura de 60°C, astfel încât după 90 de minute de tratament termic, enzima își menține doar 54±3,23% din activitatea enzimatică inițială.

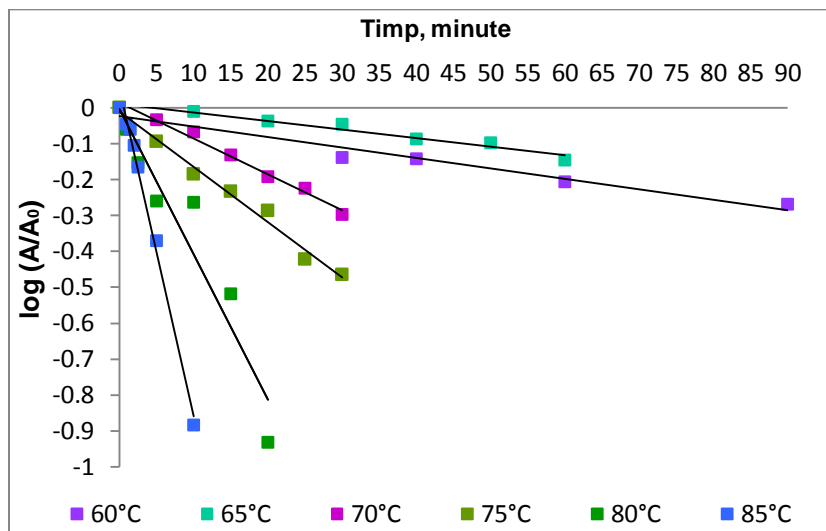


Figura 5.16. Cinetica de inactivare a PFO din prune

5.1.3.7. Stabilitatea la presiune înaltă a polifenoloxidazei din prune

Pentru a determina stabilitatea la presiune înaltă a PFO extrasă din *Prunus domestica*, extractul enzimatic parțial purificat a fost tratat, timp de 20 minute, la trei temperaturi diferite (10°C, 30°C, 50°C), cumulat cu tratamentul la presiuni înalte, în intervalul 300-700 MPa.

În figura 5.18, sunt prezentate valorile reziduale ale activității enzimatice, astfel încât prin tratarea extractului enzimatic la presiunea de 300 MPa, după 20 de minute de tratament, se observă o inactivare redusă a enzimei, cu numai 21% mai mică comparativ cu activitatea enzimatică înregistrată inițial la 25°C.

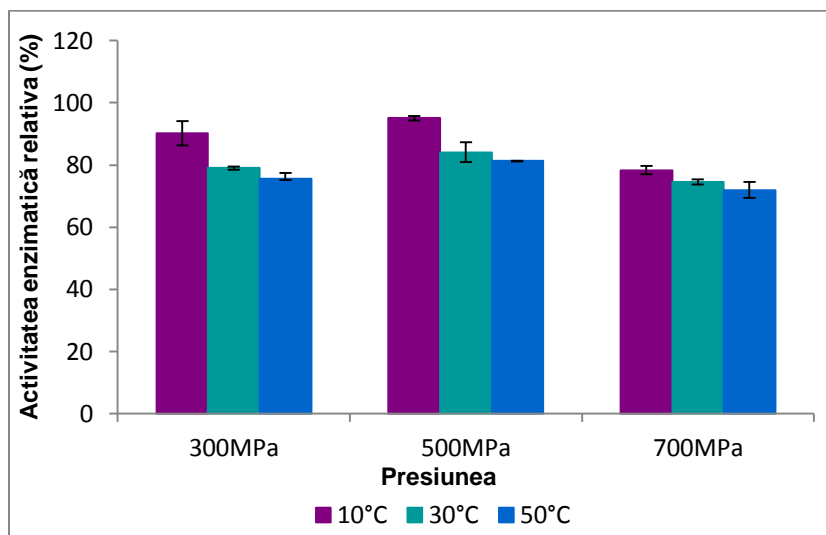


Figura 5.18. Stabilitatea la presiune înaltă a PFO din prune

Prin tratamentul la presiunea de 500 MPa timp de 20 de minute, la temperatura de 50°C, s-a obținut o inactivare de 25% a activității extractului enzimatic, în timp ce, la presiunea de 700 MPa, după 20 de minute și la temperatura de 50°C, enzima își pierde doar 28% din activitatea enzimatică inițială. În urma experimentelor efectuate s-a observat că PFO extrasă din prune prezintă stabilitate la tratamentul cu presiune înaltă.

5.2. Caracterizarea biochimică a peroxidazei din prune

5.2.1. Introducere

Toate plantele sunt bogate în POD. Surse excelente sunt hreanul și ridichea neagră. Peroxidazele din țesuturile vegetale lezate sau secționare, oxidează polifenolii pe care-i transformă în chinone de culoare închisă, afectând culoarea fructelor și legumelor în timpul prelucrării lor, provocând procesul de îmbrunare enzimatică, proces ce prezintă o importanță deosebită în industria alimentară. Având în vedere importanța practică a peroxidazelor, studiul enzimelor din diferite surse și caracterizarea comportamentului cinetic prezintă importanță

deosebită în cercetarea fundamentală și aplicativă. În acest context se înscrie și studiul POD extrase din prune (*Prunus domestica*), având în vedere datele limitate existente în literatura de specialitate referitoare la peroxidazele din această sursă.

5.2.2. Materiale și metode

Materialele și reactivii utilizați sunt similare cu cele prezentate în subcapitolul 5.1.2. În plus s-au mai utilizat guaiacol, pirogalol și peroxid de hidrogen, de puritate analitică.

Investigațiile au fost similare cu cele prezentate la subpunctul 5.1.2.

5.2.3. Rezultate și discuții

5.2.3.1. Extracția și purificarea parțială a peroxidazei din prune

În figura 5.20 se poate observa, profilul de eluare a extractului parțial purificat prin precipitare cu sulfat de amoniu aplicat pe coloana HiPrep Phenyl FF 16/10 (cromatografie prin interacțiuni hidrofobe). Prin eluarea în gradient liniar cu soluție 20 mM tampon fosfat (pH 7,0) au fost evidențiate două peak-uri distincte, ce au prezentat valori diferite ale absorbânței la 280 nm. În ceea ce privește activitatea enzimatică relativă, valoarea determinată în peak-ul 1 este cu aproximativ 40% mai mică decât valoarea determinată în peak-ul 2.

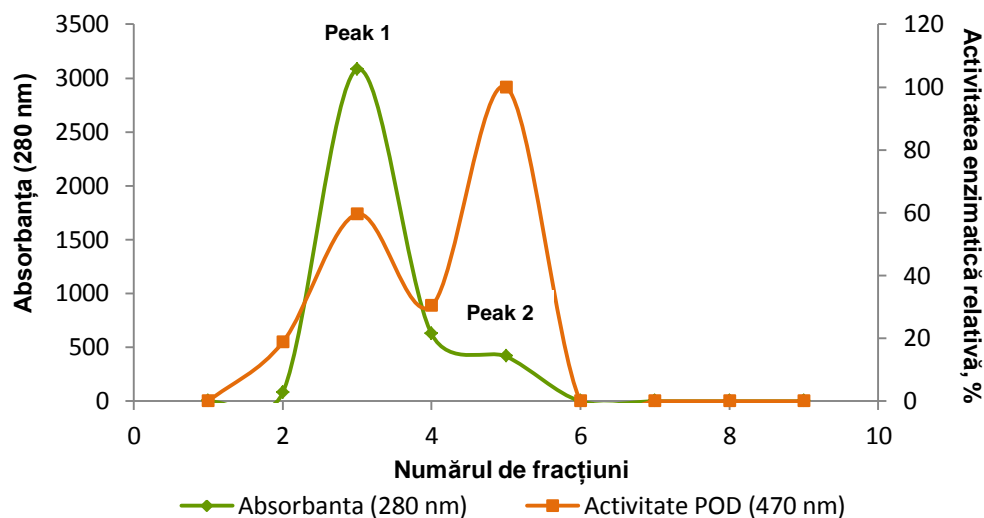


Figura 5.20. Profilul de eluare a extractului parțial purificat în urma precipitării cu sulfat de amoniu prin coloana HiPrep Phenyl FF 16/10 (cromatografie prin interacțiuni hidrofobe) în funcție de absorbanta la 280 nm și activitatea enzimatică relativă a POD

În figura 5.21, se poate observa profilul de eluare a fracțiunii active colectată și concentrată prin liofilizare de pe coloana HiPrep Phenyl FF 16/10 (cromatografie prin interacțiuni hidrofobe) aplicată pe coloana Mono Q 5/50 GL (cromatografie prin schimb ionic).

Prin eluarea în gradient vertical (0-100%) cu o soluție 20 mM tampon fosfat și NaCl 1,0 M (pH 7,0), s-a observat prezența unui singur peak (figura 5.21).

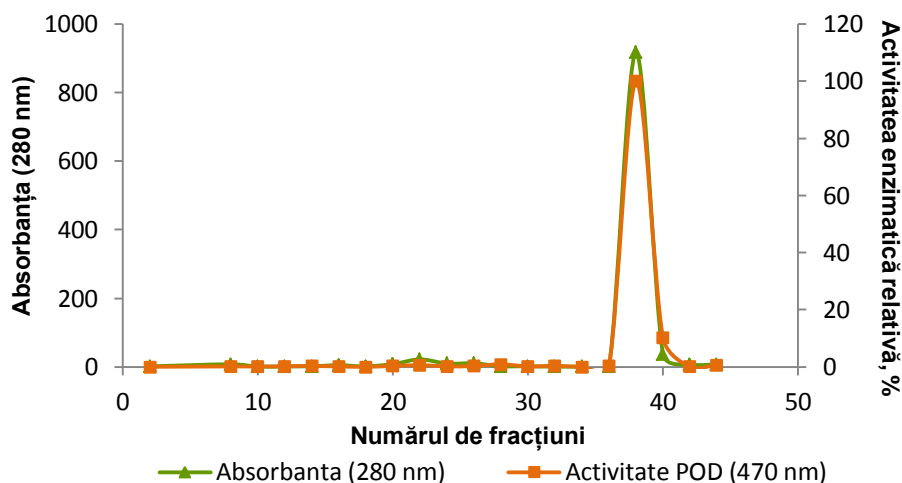


Figura 5.21. Profilul de eluare a fracțiunii active colectată de pe coloana HiPrep Phenyl FF 16/10 (cromatografie prin interacțiuni hidrofobe) aplicată pe coloana Mono Q 5/50 GL (cromatografie prin schimb ionic) în funcție de absorbanta la 280 nm și activitatea enzimatică relativă a POD

Ultima etapă de purificare, prin cromatografie prin schimb ionic, a evidențiat un factor de recuperare destul de mic și anume 3,79, în timp ce valoarea pentru activitatea enzimatică specifică a crescut de două ori față de cea de-a doua fracțiune colectată prin cromatografie prin interacțiuni hidrofobe (HIC). Activitatea specifică pentru ultima etapă de purificare a fost de 2345865 unități/mg. Această activitate corespunde factorului de purificare de 26,33.

Tabelul 5.8. Gradul de purificare al POD și determinarea conținutului de proteine prin metoda Bradford

Fracțiunea	Volum (mL)	Proteine (mg/mL)	Proteine totale (mg)	Activitate enzimatică totală	Activitate specifică (unități/mg)	Grad purificare	Grad recuperare (%)
Extract brut	700	2,031	1421,7	126631579	89071	1	100
Precipitare cu 30-90% (NH ₄) ₂ SO ₄	100	1,134	113,4	40601504	358038	4,01	24,87
HIC peak I	7	0,139	0,973	780000	801644	9	11,11
HIC peak II	5	0,027	0,135	180451	1336675	15	6,67
Mono Q	7	0,025	0,175	410526	2345865	26,33	3,79

5.2.3.2. Masa moleculară a peroxidazei din prune

Pentru a se determina gradul de puritate și masa moleculară a POD extrasă din prune s-a ținut cont de factorul de migrare relativă (Rf) al acestei proteinei în gelul SDS-PAGE, prin

raportarea acestuia la ecuația de regresie a curbei standard (figura 5.22). Astfel, masa moleculară pentru POD, obținută prin procesul de purificare cromatografică, prin interacțiuni hidrofobe (liniile 2 și 6) urmată de cea prin schimb ionic (liniile 3 și 7), a fost estimată la valoarea de 58 kDa.

Prin migrarea extractului proteic, parțial purificat cu persulfat de amoniu, în gel, în condiții nenedenaturante s-a evidențiat o singură bandă rezultată din activitatea enzimatică a POD asupra soluției de guaiacol 0,08 M cu 3% apă oxigenată, pH 6,5. Astfel, prin incubarea gelului în substratul specific pentru POD, timp de 30 de minute s-a identificat singura bandă de culoare cărămie, corespunzătoare acestei enzime (figura 5.22 – linia 8).

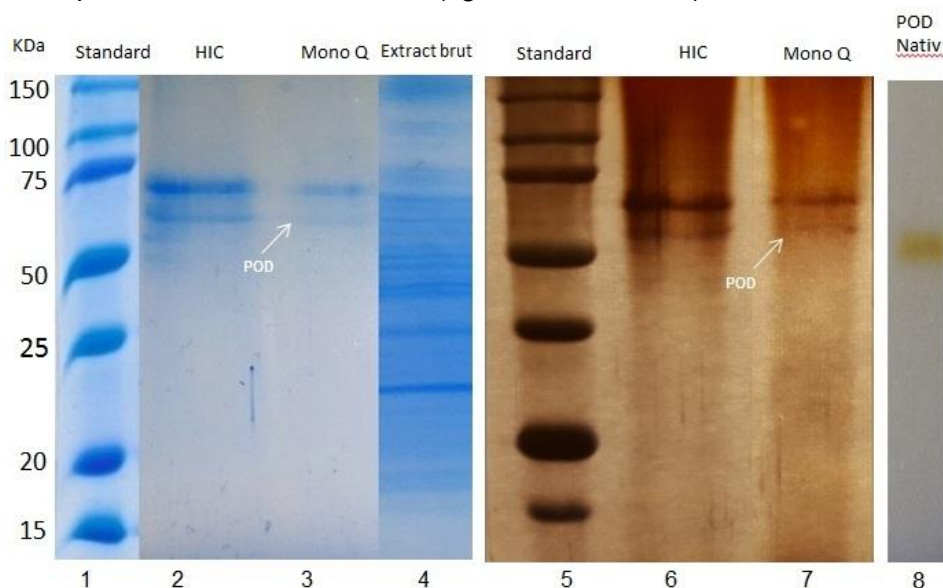


Figura 5.22. Electroforeza în gel a extractului brut și a fracțiunilor ce au prezentat activitate enzimatică pentru POD. Liniile 1-4 (SDS-page, colorare cu albastru brilliant de Coomassie G-250; liniile 5-8 (SDS-page, colorare cu nitrat de argint). Liniile 1 și 5 - Marker molecular Precision Plus Protein Dual Xtra; Liniile 2 și 6 – extract purificat pe HiPrep Phenyl FF 16/10; Liniile 3 și 7 – extract purificat pe Mono Q 5/50 GL; Liniile 4 și 8 – Extract brut; Linia 5 (Native – page) – extract brut.

5.2.3.5. Efectul pH-ului asupra proprietăților catalitice ale peroxidazei

Stabilitatea la pH a peroxidazei extrase din prune

Stabilitatea POD a fost evaluată pe parcursul a trei zile. Enzima a fost termostată la valori de pH cuprinse între 3,0-9,0, rezultatele fiind prezentate în figura 5.28. Cele mai mari valori ale activității enzimatic relative au fost obținute pentru valorile de pH 6,5 și 7,0, acestea fiind în concordanță cu valorile obținute la determinarea pH-ului optim de activitate. La valorile de pH 3,0; 4,0 și 5,0 POD extrasă din prune își menține 29%, 20% și respectiv 30% din activitatea enzimatică inițială, după 48 h de la începutul experimentului.

Enzima prezintă stabilitate în domeniul de pH acid, menținându-și peste 70% din activitatea enzimatică, în timp ce, în domeniul de pH alcalin, POD își menține peste 60% din activitatea enzimatică maximă.

Cea mai mare stabilitate a enzimei se poate observa la valoarea de pH 6,5, valoare corespunzătoare valorii de pH optim, cu o pierdere de, aproximativ, 30%, după 72 de ore de tratament, comparativ cu activitatea inițială.

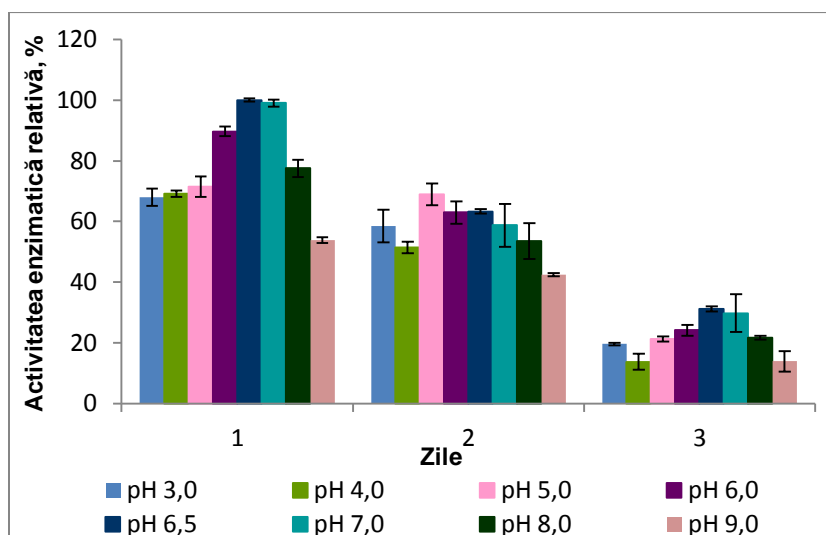


Figura 5.28. Stabilitatea la pH a POD

5.2.3.6. Efectul temperaturii asupra peroxidazei

Stabilitatea la temperatură a peroxidazei

Pentru a determina stabilitatea la temperatură a POD extrase din *Prunus domestica*, enzima a fost termostată la temperaturi cuprinse între 25-85°C, pentru perioade de timp de 10, 15 și 20 minute, comparativ cu enzima netratată termic. Rezultatele obținute (figura 5.30.) atestă faptul că valoarea maximă a activității enzimatică a fost obținută la temperatura de 25°C. Activitatea POD este cu 37% mai redusă la temperatura de 70°C, iar cea mai mică valoare, de 25%, a fost obținută la temperatura de 85°C, după 20 minute de tratament.

În ceea ce privește stabilitatea POD extrasă din prune, enzima prezintă o stabilitate mai ridicată în intervalul de temperatură situat între 60°C-70°C, menținându-și între 63% - 80% din activitate. În intervalul 75-85°C, activitatea enzimatică scade brusc iar procesul de inactivare este mai accentuat.

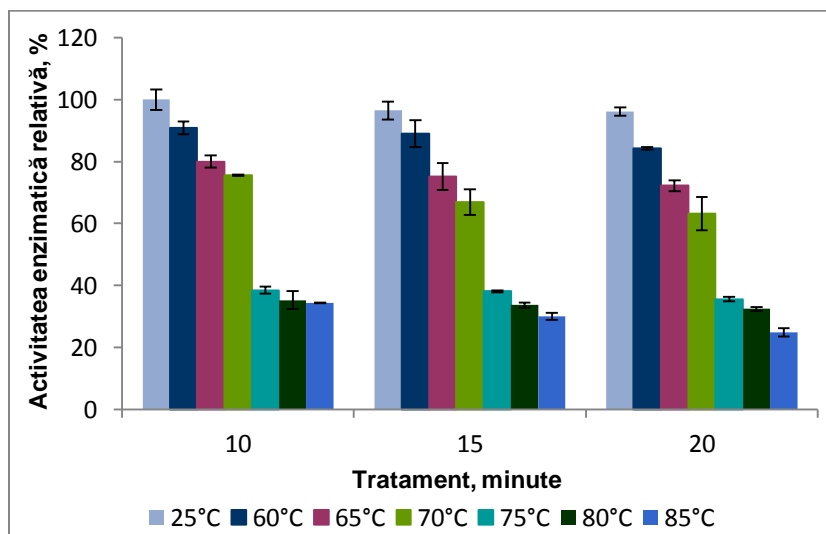


Figura 5.30. Stabilitatea la temperatură a POD din prune

Studiul inactivării termice a POD extrasă din *Prunus domestica* s-a realizat în intervalul de temperatură 60-85°C. În figura 5.31 se prezintă variația parametrilor cinetici, care au fost calculați din panta liniară a logaritmului zecimal și timpul de inactivare, la temperatură constantă.

Conform rezultatelor obținute se observă că inactivarea termică a POD extrase din prune este descrisă de un model de ordinul I, în domeniul de temperatură studiat.

La temperatura de 75°C, POD își menține 26,89±1,88% din activitatea enzimatică inițială, după 30 de minute de tratament termic, iar la temperatura de 85°C, enzima își menține doar 24±1,31% din activitatea înregistrată inițial, după 20 minute de tratament termic.

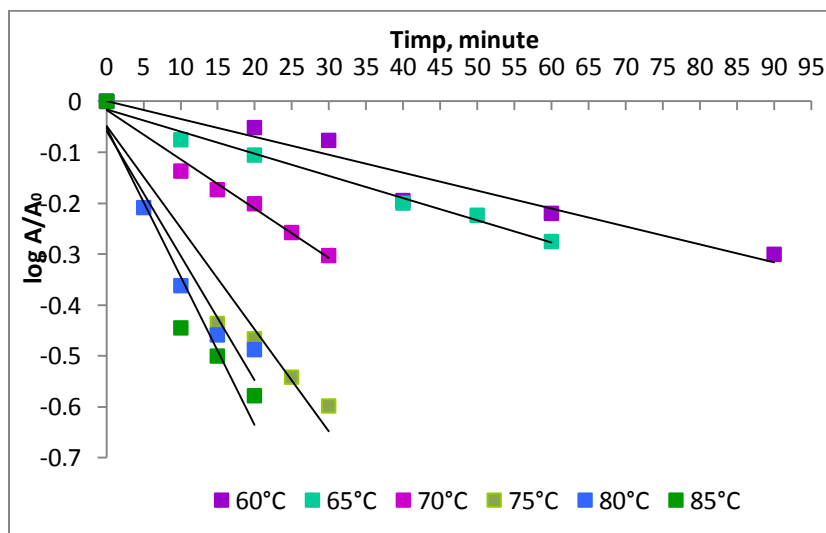


Figura 5.31. Corelațiile liniare ce descriu inactivarea termică a POD din prune

5.2.3.7. Stabilitatea la presiune înaltă a peroxidazei

Pentru a determina stabilitatea la presiune înaltă a POD extrasă din *Prunus domestica*, enzima a fost tratată la trei temperaturi diferite (10°C, 30°C, 50°C), prin presurizarea probelor, timp de 20 minute, în domeniul de presiune cuprins între 300-700 MPa.

În figura 5.33, sunt prezentate valorile activității enzimice ale POD extrasă din prune, astfel încât la presiunea de 300 MPa, după 20 de minute de tratament, la temperatura de 50°C, se observă o inactivare redusă a enzimei cu numai 32% raportat la activitatea enzimatică înregistrată inițial la temperatura de 25°C.

La presiunea de 500 MPa, se poate observa o inactivare a enzimei de 23,88%, după 20 de minute de tratament, la temperatura de 50°C, în timp ce, la 700 MPa, după 20 de minute și la temperatura de 50°C, enzima își pierde doar 26,98% din activitatea enzimatică inițială. În urma experimentelor efectuate, se poate aprecia că POD extrasă din prune prezintă stabilitate, la tratament combinat presiune înaltă-temperatură, într-un domeniu larg de valori.

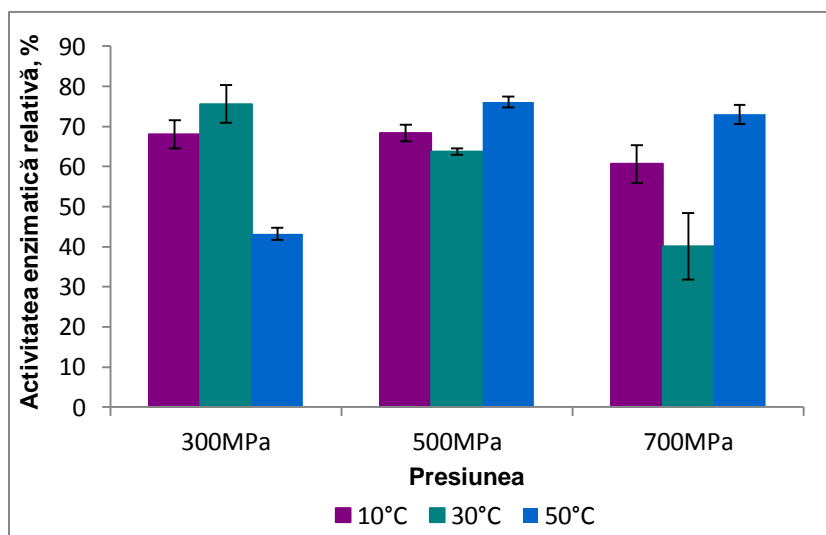


Figura 5.33. Stabilitatea la presiune înaltă și temperaturi diferite a POD din prune

5.3. Concluzii parțiale

Cercetările au urmărit fundamentarea cunoștințelor referitoare la extracția și caracterizarea PFO și a POD extrase din prune autohtone, specia *Prunus domestica*, având în vedere implicațiile practice ale acestor enzime în știința și ingineria alimentelor, dar și în alte domenii, industria farmaceutică, industria cosmetică și în procese de bioremediere.

Extractul enzimatic parțial purificat utilizat în experimente s-a caracterizat printr-un conținut de proteine de 0,175 mg, prezentând activitate enzimatică atât pentru PFO cât și pentru POD. Gradul de purificare pentru PFO a fost de 32,81 iar gradul de recuperare a fost de 3,04%, în

timp ce pentru POD s-a înregistrat un grad de purificare de 26,33, cu un factor de recuperare de 3,79%.

În urma reacțiilor specifice enzimă-substrat s-au putut identifica cele două enzime, inclusiv după migrare în gel de poliacrilamidă, în condiții nednaturante și, totodată s-a realizat o estimare a maselor lor moleculare, în funcție de migrarea relativă a acestora comparativ cu markerul proteic, în prezența compușilor denaturanți. Astfel, masa moleculară calculată pentru PFO a fost de aproximativ 65 kDa, în timp ce pentru POD s-a estimat la aproximativ 58 kDa.

PFO prezintă cea mai mare afinitate pentru substratul catechol, valorile parametrilor cinetici fiind K_m 26,3±4,4 mM, iar V_{max} a fost de 1193,4±68,05 DO/min, în timp ce POD prezintă cea mai mare afinitate pentru substratul guaiacol, parametrii cinetici fiind de K_m 11,3±6.98 mM, iar V_{max} a fost de 1749±587,7 DO/min.

Cei mai eficienți inhibitori ai celor două enzime extrase din prune s-au dovedit a fi acidul ascorbic și L-cisteina.

Enzimele prezintă o stabilitate ridicată în domeniul de pH 4,0 - 6,0 cât și în domeniul de temperatură 50-60°C.

Fenomenul de inactivarea termică a celor două enzime urmează modele cinetice de ordinul I, la temperaturi cuprinse între 60-85°C.

În ceea ce privește tratamentul la presiune înaltă, PFO extrasă din prune este destul de stabilă, la presiuni cuprinse între 300-700 MPa, 50°C, enzima își menține peste 65% din activitatea enzimatică înregistrată inițial după o perioadă de 50 de minute, comparativ cu POD care își menține peste 43% din activitatea enzimatică determinată inițial, în aceleași condiții de tratament.

6. Concluzii generale

Teza de doctorat a vizat studiul comportamentului tehnologic și molecular precum și a proprietăților catalitice ale enzimelor oxidative implicate în oxidarea compușilor fenolici, cu impact în îmbrunarea enzimatică a produselor vegetale neprocesate. Pe baza rezultatelor experimentale obținute și a concluziilor parțiale prezentate la finalul fiecărui capitol din partea experimentală, sunt evidențiate sumativ o serie de concluzii generale, după cum urmează:

Spectroscopia de luminescență și tehnicile de analiză *in silico*, care au fost utilizate ca mijloc de monitorizare a modificărilor conformaționale, au relevat că enzimele oxidative trec printr-o serie de transformări moleculare ce includ procese de depliere, pliere, oligomerizare, subliniind astfel prezența unor specii moleculare susceptibile la transformări induse de tratamentele termice și în urma modificării pH-ului.

Moleculele enzimelor parcurg etape de tranziție, până ajung la o stare de depliere și expunere a resturilor hidrofobe în domeniul de pH acid și la temperaturi ridicate, în timp ce, în domeniul alcalin și la temperaturi joase, acestea prezintă o structură compactă.

Polifenoloxidaza și peroxidaza din prune, specia *Prunus domestica*, pot fi extrase și purificate parțial, prin precipitarea cu sulfat de amoniu, cromatografie prin schimb ionic și cromatografie prin interacțiuni hidrofobe, obținându-se un grad destul avansat de purificare.

Condițiile optime de activitate pentru cele două enzime au fost stabilite a fi temperatura de 25°C și pH 6,0 pentru polifenoloxidază și, respectiv, pH 6,5 pentru peroxidază, utilizând ca substrat catechol 0,01 M, pentru polifenoloxidaza și guaiacol 0,08 M, pentru peroxidază.

Cei mai eficienți inhibitori ai celor două enzime oxidative extrase din prune s-au dovedit a fi acidul ascorbic și L-cisteina.

Enzimele prezintă stabilitate ridicată în domeniul de pH acid și la temperaturi cuprinse în domeniul 50-60°C. Inactivarea termică a celor două enzime urmează modele cinetice de ordinul I, în domeniul de temperaturi cuprinse între 60-85°C.

În ceea ce privește tratamentul la presiune înaltă, la presiuni cuprinse între 300-700 MPa și temperaturi de 10-50°C, enzimele oxidative extrase din prune prezintă o stabilitate ridicată, fiind astfel necesar un tratament mai agresiv, prelungit, pentru inactivarea acestora.

În prezent, înțelegerea detaliată și completă a funcționării polifenoloxidazei și peroxidazei din surse vegetale rămâne încă dificilă, din cauza purificării îngreunate și existenței numeroaselor izoforme, latente sau active.

Studiile realizate au valoare de cercetare fundamentală și aplicativă, datele obținute putând constitui elemente de referință pentru extracția și caracterizarea unor enzime oxidative din surse noi sau pentru stabilirea unor condiții eficiente de procesare a fructelor și legumelor care să asigure stabilitatea biochimică a produselor finite, în acord cu standarde moderne de calitate.

7. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective

Originalitatea cercetărilor efectuate, în conformitate cu obiectivele științifice ale tezei de doctorat, se concretizează printr-o serie de elemente de noutate, care sporesc valoarea științifică a studiilor efectuate. Astfel, contribuțiile originale ale tezei de doctorat pot fi rezumate după cum urmează:

S-au studiat în detaliu modificările conformaționale induse de diferite valori ale pH-ului și ale temperaturii în moleculele de tirozinază și peroxidază prin utilizarea tehnicilor de spectroscopie de fluorescență și tehnicilor de analiză *in silico* pentru a stabili corelațiile proces-structură-funcție. Combinarea acestor abordări este destul de limitată în literatura de specialitate, ceea ce oferă numeroase date originale cu valoare de cercetare fundamentală și aplicativă

Din punctul de vedere al cercetării, funcționalității și a stabilității polifenoloxidazei și peroxidazei, deși cele două enzime oxidative, au fost studiate în numeroase ocazii, caracterizarea enzimelor extrase din prune (*Prunus domestica*) autohtone nu s-a realizat până în prezent.

Din punct de vedere practic, cunoscând condițiile de pH, temperatură și presiune care pot induce inactivarea enzimelor oxidative, se asigură premise importante pentru îmbunătățirea calității senzoriale a fructelor, legumelor și a produselor derivate, în stare proaspătă sau procesate. Datele obținute constituie elemente de referință pentru cercetările viitoare, cu importanță științifică și aplicativă pentru înțelegerea modificărilor conformaționale survenite în urma unor tratamente implicate în procesare și stabilirea unor tehnici eficiente și moderne de tratament a fructelor și legumelor, asigurând astfel calitatea produselor obținute.

Testarea potențialului oxidativ al polifenoloxidazelor și peroxidazelor purificate, după extracția din *Prunus domestica*, asupra celulelor maligne, poate reprezenta un pas important spre noi cercetări aplicative din domeniul medical cât și din cel farmaceutic.

Totodată, determinarea structurii cristalografice a acestor enzime, creează noi perspective cu implicații deosebite în biotehnologia modernă.

8. Diseminarea rezultatelor cercetărilor

Diseminarea rezultatelor cercetărilor efectuate pe parcursul studiilor doctorale s-a materializat prin publicarea sau comunicarea unor lucrări științifice după cum urmează:

A. Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **Ioniță, E.**, Aprodu, I., Stănciuc, N., Râpeanu, G., Bahrim, G., 2014. Advances in structure-function relationships of tyrosinase from *Agaricus bisporus* – Investigation on heat-induced conformational changes. *Food Chemistry*, 156, 129–136.
2. **Ioniță, E.**, Stănciuc, N., Aprodu, I., Râpeanu, G., Bahrim, G., 2014. pH-induced structural changes of tyrosinase from *Agaricus bisporus* using fluorescence and in silico methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(11), 2338-2344.
3. Stănciuc, N., Aprodu, I., **Ioniță, E.**, Bahrim, G., Râpeanu, G., 2015. Exploring the process–structure–function relationship of horseradish peroxidase through investigation of pH- and heat induced conformational changes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 147, 43–50.
4. **Ioniță, E.**, Gurgu, L., Stănciuc, N., Aprodu, I., Bahrim, G., Râpeanu, G., 2016. Characterization, purification and temperature/pressure stability of polyphenol oxidase extracted from plums (*Prunus domestica*). Manuscris în pregătire, 2016.
5. **Ioniță, E.**, Gurgu, L., Stănciuc, N., Aprodu, I., Bahrim, G., Râpeanu, G., 2016. Extraction, partial purification and processing stability of peroxidase extracted from plums (*Prunus domestica*). Manuscris în pregătire, 2016.

B. Articole publicate în reviste indexate în baze de date internaționale

1. **Elena Ioniță**, 2013. Plant polyphenol oxidase: Isolation and characterization. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 13, 1-10.

C. Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale

1. **Elena Ioniță**, Gabriela Râpeanu, Nicoleta Stănciuc, Istvan Dalmadi, Iuliana Aprodu, Gabriela Bahrim, Thermal and High Pressure Stability of Peroxidase Extracted from Plums. European Biotechnology Congress, 7-9 mai 2015, București, România.
2. **Elena Ioniță**, Mădălina Munteanu, Nicoleta Stănciuc, Gabriela Râpeanu, Gabriela Bahrim, Extraction and characterization of peroxidase from red plums (*Prunus domestica*). Al 7-lea Simpozion Internațional EuroAliment, 24-26 septembrie 2015, Galați, România.
3. **Elena Ioniță**, Nicoleta Stănciuc, Gabriela Râpeanu, Gabriela Bahrim, Investigations on pH Induced Structure-Function Relationships of Tyrosinase from *Agaricus bisporus*. Al 6-lea Simpozion Internațional EuroAliment, 3-5 octombrie 2013, Galați, România.
4. **Elena Ioniță**, Nicoleta Stănciuc, Gabriela Râpeanu, Iuliana Aprodu, Gabriela Bahrim, Extraction and partial purification of polyphenol oxidase from *Prunus domestica*. Al 13-lea Simpozion Internațional "Perspective ale agriculturii mileniului 3", 25-27 Septembrie 2014, Cluj-Napoca, România.

D. Lucrări comunicate la manifestări științifice naționale

1. **Elena Ioniță**, Nicoleta Stănciuc, Gabriela Bahrim, The pH and heat-induced structural changes of tyrosinase from *Agaricus bisporus* using fluorescence spectroscopy. Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG, 16-17 mai 2013, Galați, România.
2. **Elena Ioniță**, Nicoleta Stănciuc, Gabriela Râpeanu, Gabriela Bahrim, Iuliana Aprodu, Evaluation of pH and heat-induced conformational changes of peroxidase from *Armoracia rusticana* using Fluorescence Spectroscopy. Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG 2014, 15-16 mai 2014, Galați, România.
3. **Elena Ioniță**, Nicoleta Stănciuc, Gabriela Râpeanu, Iuliana Aprodu, Gabriela Bahrim, Thermal inactivation of polyphenol oxidase extracted from plums (*Prunus domestica*) – a kinetic study. Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG 2015, 4-5 iunie 2015, Galați, România.
4. **Elena Ioniță**, Leontina Gurgu, Gabriela Râpeanu, Nicoleta Stănciuc, Iuliana Aprodu, Gabriela Bahrim, Extraction, purification and biochemical characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from Romanian plums (*Prunus domestica*). Conferința Științifică

a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG 2015, 2-3 iunie 2016, Galați,
România.