

ROMÂNIA
MINISTERUL EDUCAȚIEI, CERCETĂRII, TINERETULUI ȘI SPORTULUI
UNIVERSITATEA DUNĂREA DE JOS DIN GALAȚI

Strada Domnească nr. 47, cod poștal 800008
Galați, România
E-mail: rectorat@ugal.ro



Tel.: (+4) 0336-130.109; 0336-130.108; 336-130.104
Fax: (+4) 0236 - 461.353
www.ugal.ro

C4814/12-05-2011

Către

Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați vă face cunoscut că în data de _____, ora _____, în sala _____, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată: "Evaluarea potențialului bacteriilor din biotopul Antarctica privind obținerea de hidrolaze adaptate la temperaturi scăzute", elaborată de domnul/doamna ing. SCÂNTEE MIHAELA(COTĂRLET), în vederea conferirii titlului științific de doctor în Domeniul de doctorat - Inginerie industrială.

Comisia de doctorat are următoarea componență :

- Președinte:** Prof.univ.dr.ing. Elisabeta BOTEZ
*Prodecan – Facultatea de Științe și Ingineria Alimentelor
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați*
- Conducător de doctorat:** Prof.univ.dr.ing. Gabriela-Elena BHRIM
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați
- Referent 1:** Prof.univ.dr.ing. Peter STOUGAARD
University of Copenhagen
- Referent 2:** Prof.univ.dr.ing. Cătălin TĂNASE
Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" din Iași
- Referent 3:** Prof.univ.dr.ing. Anca-Ioana NICOLAU
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Cu această ocazie vă transmitem rezumatul tezei de doctorat și vă invităm să participați la susținerea publică. În cazul în care doriți să faceți eventuale aprecieri sau observații asupra conținutului lucrării, vă rugăm să le transmiteți în scris pe adresa Universității, str. Domnească nr. 47, 800008 - Galați, Fax - 0236 / 461353.

RECTOR,
Prof.dr.ing. Viorel MÎNZU

SECRETAR DOCTORAT,

Ing. Luiza AXINTE

**UNIVERSITATEA DUNĂREA DE JOS
FACULTATEA DE ȘTIINȚA ȘI INGINERIA ALIMENTELOR**

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

**EVALUAREA POTENȚIALULUI BACTERIILOR DIN
BIOTOPUL ANTARCTICA PRIVIND OBTINEREA DE
HIDROLAZE ADAPTATE LA TEMPERATURI SCĂZUTE**

**Doctorand
Ing. Mihaela (SCÂNTEE) COTĂRLEȚ**

**Coordonator științific
Prof.dr.ing. Gabriela-Elena BHRIM**

**GALAȚI
2011**

CUPRINS

1. MICROORGANISME ADAPTATE LA TEMPERATURI SCĂZUTE, POTENȚIALI AGENȚI ÎN BIOTEHNOLOGIA PREPARATELOR ENZIMATICE	3
2. CARACTERE TAXONOMICE, MORFOLOGICE ȘI FIZIOLOGICE ALE BACTERIILOR DIN GENUL <i>STREPTOMYCES</i>	7
2.1. Răspândirea și potențialul enzimatic al bacteriilor din genul <i>Streptomyces</i>	7
2.2. Taxonomia bacteriilor din genul <i>Streptomyces</i>	8
2.3. Caractere culturale ale streptomicetelor.....	10
2.4. Reproducerea streptomicetelor	14
2.5. Metode de izolare și conservare a bacteriilor din genul <i>Streptomyces</i>	17
3. CONDIȚII BIOTEHNOLOGICE DE OBȚINERE A HIDROLAZELOR, DE TIPUL AMILAZE ȘI PROTEAZE, CU STREPTOMICETE	22
3.1. Sisteme de cultivare utilizate pentru obținerea de amilaze și proteaze ...	22
3.2. Cantitatea și tipul culturii starter	24
3.3. Factorii fizico-chimici care influențează biosinteza de amilaze și proteaze la tulpini de streptomicete	24
3.4. Influența aerării și agitării asupra creșterii streptomicetelor și biosintezei proteazelor și amilazelor	26
3.5. Compoziția mediilor fermentative recomandate pentru obținerea de amilaze și proteaze cu ajutorul streptomicetelor	27
3.6. Îmbunătățirea randamentului de biosinteză a amilazelor și proteazelor prin tehnici de inginerie genetică	34
4. PROPRIETĂȚILE CATALITICE ALE HIDROLAZELOR ACTIVE LA TEMPERATURI SCĂZUTE SINTETIZATE DE STREPTOMICETE	35
4.1. Mecanismul de acțiune și proprietățile catalitice ale enzimelor amilolitice.....	35
4.2. Mecanismul de acțiune și proprietățile catalitice ale proteazelor.....	37
4.3. Importanța practică a obținerii hidrolazelor (amilaze și proteaze) active la temperaturi scăzute	40
Referințe bibliografice.....	46
5. IZOLAREA DIN BIOTOPURI POLARE (ANTARCTICA) ȘI SELECȚIA UNOR STREPTOMICETE POTENȚIAL PRODUCĂTOARE DE AMILAZE ȘI PROTEAZE, ACTIVE LA TEMPERATURI SCĂZUTE	
5.1. Introducere.....	57
5.2. Materiale și metode.....	59
5.2.1. Materiale	59

5.2.2. Medii de cultură	59
5.2.3. Reactivi.....	60
5.2.4. Aparatura utilizată în determinări.....	60
5.2.5. Metode de analiză	61
• Metode de izolare, întreținere și conservare a culturilor pure de bacterii aparținând genului <i>Streptomyces</i>	61
• Metode de selecție pentru evidențierea tulpinilor de <i>Streptomyces</i> spp. producătoare de hidrolaze	61
• Tehnici clasice și moderne de evaluare a potențialului enzimatic al tulpinilor selecționate	63
5.3. Rezultate și discuții.....	73
5.3.1. Izolarea streptomicetelor din habitaturi polare	73
5.3.2. Selecția calitativă a tulpinilor de <i>Streptomyces</i> spp. producătoare de amilaze și proteaze, active la temperaturi scăzute	73
5.3.3. Studiul comportamentului streptomicetelor polare selecționate prin cultivare submersă la temperaturi scăzute.....	85
5.3.4. Evaluarea pe criterii cantitative a potențialului streptomicetelor selecționate de a produce hidrolaze active la temperaturi scăzute... ..	86
5.4. Concluzii	89
Referințe bibliografice	90
6. CARACTERIZAREA BIOCHIMICĂ ȘI GENETICĂ A TULPINILOR SELECȚIONATE DE STREPTOMICETE POLARE	
6.1. Introducere.....	93
6.2. Materiale și metode.....	94
6.2.1. Materiale	94
6.2.2. Medii de cultură	95
6.2.3. Reactivi, kit-uri și programe	97
6.2.4. Infrastructura de cercetare	97
6.2.5. Metode de analiză	98
• Metoda Biolog pentru caracterizarea biochimică	100
• Tehnici de caracterizare filogenetică a tulpinilor de streptomicete polare selecționate.....	100
6.3. Rezultate și discuții.....	105
6.3.1. Caracterizarea morfologică și biochimică a tulpinilor selecționate de streptomicete polare	105
6.3.2. Caracterizarea genetică a tulpinilor selecționate.....	108
• Izolarea ADN-ului cromozomal (ADNcr)	108
• Verificarea purității ADN-ului prin electroforeză în gel de agaroză.....	109
• Determinarea spectrofotometrică a purității transformanților	109
• Analiza electroforetică a ADN-ului plasmidial	110
• Analiza filogenetică a tulpinilor polare selecționate	111
6.4. Concluzii.....	113

<i>Referințe bibliografice</i>	114
7. OPTIMIZAREA COMPOZIȚIEI MEDIILOR FERMENTATIVE PENTRU CONTROLUL SINTEZEI HIDROLAZELOR DIN COMPLEXUL ENZIMATIC	
7.1. Introducere	117
7.2. Materiale și metode	119
7.2.1. Materiale	119
7.2.2. Medii de cultură	119
7.2.3. Infrastructura de cercetare	122
7.2.4. Metode de analiză	122
• Metode de întreținere și conservare a culturilor pure de bacterii aparținând genului <i>Streptomyces</i>	122
• Metode de cultivare a streptomicetelor și recuperarea enzimelor extracelulare	122
• Tehnici de evaluare a activității hidrolazelor în extractul enzimatic brut	122
• Metode de optimizare statistică a compoziției mediilor fermentative pentru creșterea randamentului de biosinteză a enzimelor din complexul enzimatic	123
7.3. Rezultate și discuții	129
7.3.1. Identificarea compușilor chimici semnificativi în procesul de biosinteză a hidrolazelor, active la temperaturi scăzute, folosind modelul experimental Plackett-Burman	129
7.3.2. Optimizarea compoziției mediilor fermentative folosind metoda suprafeței de răspuns	138
7.4. Concluzii	156
<i>Referințe bibliografice</i>	158
8. EVALUAREA CONDIȚIILOR FIZICO-CHIMICE DE ACȚIUNE A HIDROLAZELOR SINTETIZATE DE TULPINA PSIHROTOLERANTĂ, <i>STREPTOMYCES 4</i> ALGA, ÎN PREPARATE BRUTE ȘI PURIFICATE	
8.1. Introducere	162
8.2. Materiale și metode	162
8.2.1. Materiale	162
8.2.2. Medii de cultură.....	162
8.2.3. Echipamente utilizate în determinări.....	163
8.2.4. Metode de analiză.....	163
• Metode de întreținere și conservare a culturilor pure de bacterii aparținând genului <i>Streptomyces</i>	163
• Metode de cultivare și recuperare a enzimelor extracelulare.....	163
• Tehnici de evidențiere a proprietăților catalitice a hidrolazelor utilizând substraturi cromogene insolubile, pe bază de AZCL ..	164
• Evaluarea activității hidrolazelor în extractelor brute.....	164

• Metoda colorimetrică de determinarea activității alfa-amilazice utilizând substratul cromogen solubil amidon-roșu.....	165
• Strategia de purificare a alfa-amilazei din complexul enzimatic brut.....	167
8.3. Rezultate și discuții.....	171
8.3.1. Evaluarea proprietăților catalitice de acțiune ale hidrolazelor.....	171
8.3.2. Strategii de purificare a hidrolazelor, din extractul enzimatic activ, biosintetizate de tulpina <i>Streptomyces 4 Alga</i> sintetizate de <i>Streptomyces 4 Alga</i> , în preparate brute	178
8.3.3. Evaluarea proprietăților catalitice ale α -amilzei sintetizată de tulpina <i>Streptomyces 4 Alga</i> în preparate enzimatice parțial purificate.....	188
8.3.4. Determinarea parametrilor cinetici	191
8.3.5. Influența agenților reducători, a surfactanților și a ionilor metalici asupra funcționalității alfa-amilazei parțial purificate	193
8.4. Concluzii.....	198
<i>Referințe bibliografice</i>	199
9. CONCLUZII FINALE.....	203
10. CONTRIBUȚII LA DEZVOLTAREA CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU ȘI PERSPECTIVE.....	205

OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT

Pe plan internațional, microorganismele psihrofile reprezintă, în prezent, tentația noilor cercetări în domeniul biotehnologiei deoarece aceste microorganisme, colonizate în medii extreme, au proprietăți biotehnologice deosebite, prin capacitatea de a sintetiza noi metaboliți, noi biocatalizatori cu proprietăți deosebite și cu valoare economică, pe căi metabolice diferențiate de cele ale microorganismelor comune.

În țara noastră studiul microorganismelor psihrofile, ca producători de enzime, active la temperaturi scăzute, este de dată relativ recentă, realizări în acest domeniu putând fi menționate ca fiind ale cercetătorilor de la Departamentul de Bioinginerii, Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor, Galați, prin colaborarea cu Institutul Român de Cercetări Polare din București și Fundația Antarctică Română.

Teza de doctorat intitulată „*Evaluarea potențialului bacteriilor din biotopul Antarctica privind obținerea de hidrolaze adaptate la temperaturi scăzute*” reprezintă un demers de cercetare fundamentală modernă, situat la interdisciplinaritatea genetică – informatică – microbiologie. Demersul științific urmărește izolarea de noi microorganisme din biotopuri polare (Antarctica), selecția de tulpini de bacterii polare (genul *Streptomyces* spp.) producătoare de enzime, din categoria hidrolaze (amilaze și proteaze) precum și identificarea, caracterizarea și purificarea amilazelor și proteazelor, active la temperaturi scăzute, cu aplicații industriale.

Realizarea scopului propus a fost în concordanță cu îndeplinirea unor obiective specifice, derivate din evaluarea stadiului actual al cercetărilor pe plan mondial, privind izolarea, selecția și caracterizarea tulpinilor de streptomicete polare, potențial producătoare de enzime active la temperaturi scăzute, după cum urmează:

- Izolarea din biotopuri polare (Antarctica) și selecția unor streptomicete potențial producătoare de amilaze și proteaze, active la temperaturi scăzute.
- Caracterizarea biochimică și genetică a tulpinilor selecționate de streptomicete polare.
- Optimizarea compoziției mediilor fermentative pentru controlul biosintezei hidrolazelor din complexul enzimatic activ.
- Evaluarea condițiilor fizico-chimice de acțiune a hidrolazelor sintetizate de tulpina selecționată psihrotolerantă, *Streptomyces* 4 Alga, în preparate brute și purificate.

Teza de doctorat a fost elaborată în perioada 2007-2010, în cadrul Universității „Dunărea de Jos” Galați, Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor, Platforma de cercetare și formare „Bioaliment” și în laboratoarele Departamentului de Agricultură și Ecologie din cadrul Facultății de Științele Vieții, Universitatea din Copenhaga.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat este prezentată pe 208 de pagini și se compune din două părți: o parte de studiu documentar care conține 4 capitole și o parte de cercetări originale, structurate pe 4 capitole. Lucrarea conține 80 figuri și grafice și 51 de tabele.

STUDIUL DOCUMENTAR

Studiul documentar, intitulat *Stadiul actual al cunoașterii privind utilizarea microorganismelor psihrofile pentru obținerea de enzime cu valoare economică*, prezintă cele mai noi informații apărute pe fluxul principal de publicații în domeniul abordat, grupate în patru capitole, cu referire la:

- Microorganismele adaptate la temperaturi scăzute, potențiali agenți în biotehnologia preparatelor enzimaticе.
- Caracterele taxonomice, morfologice și fiziologice ale bacteriilor din genul *Streptomyces*.
- Condițiile biotehnologice de obținere a hidrolazelor, de tipul amilaze și proteaze, cu streptomicete selecționate.
- Proprietățile catalitice ale hidrolazelor, active la temperaturi scăzute, sintetizate de streptomicete.

STUDIUL EXPERIMENTAL

Partea experimentală prezintă rezultatele originale și contribuțiile științifice la dezvoltarea cunoașterii și este structurată în patru capitole distincte, după cum urmează.

Capitolul 5, intitulat *Izolarea din biotopuri polare (Antarctica) și selecția unor streptomicete potențial producătoare de amilaze și proteaze, active la temperaturi scăzute*, prezintă rezultatele obținute în etapa de izolare și selecție a unor streptomicete polare, potențial producătoare de amilaze și proteaze, active la temperaturi scăzute, folosind metode clasice și metode moderne de investigare.

Capitolul 6, *Caracterizarea biochimică și genetică a tulpinilor selecționate de streptomicete polare*, abordează caracterizarea biochimică și genetică a tulpinilor selecționate de streptomicete polare, utilizând cele mai moderne metode de analiză descrise de literatura de specialitate, întrucât se cunoaște dificultatea identificării bacteriilor aparținând genului *Streptomyces*.

Capitolul 7, intitulat *Optimizarea compoziției mediilor fermentative pentru controlul sintezei hidrolazelor din complexul enzimatic*, prezintă rezultatele obținute privind

optimizarea compoziției mediilor fermentative pentru controlul biosintezei enzimelor din complexul enzimatic.

Capitolul 8, denumit *Evaluarea condițiilor fizico-chimice de acțiune a hidrolazelor sintetizate de tulpina psihrotolerantă, Streptomyces 4 Alga, în preparate brute și purificate*, descrie evaluarea condițiilor fizico-chimice de acțiune a hidrolazelor sintetizate de tulpina psihrotolerantă, *Streptomyces 4 Alga*, în preparate brute și purificate.

REZULTATE EXPERIMENTALE

5. Izolarea din biotopuri polare (Antarctica) și selecția unor streptomicete potențial producătoare de amilaze și proteaze, active la temperaturi scăzute

Materiale

Probe de sol și vegetație recoltate în perioada 2004-2006, din arealele Antarctica de Est și Antarctica de Vest, zonele Munții Grove, Lacul Progress 2 și Insula King George. Probele au fost obținute prin intermediul Fundației Antarctice Române și a Institutului Român de Cercetări Polare, București.

Microorganisme - Au fost studiate 30 de tulpini de *Streptomyces* spp. dintre care:

- 7 tulpini de streptomicete polare aparținând colecției laboratorului de Microbiologie al Universității "Dunărea de Jos" din Galați (indicativ MIUG), conservate prin păstrare sub ulei de parafină steril;
- 23 de tulpini de streptomicete polare nou izolate în timpul desfășurării programului de cercetare doctorală.

Reactivi

Substraturile cromogene insolubile (AZCL-Amylose, AZCL-Casein), precum și substratul cromogen solubil amidon-roșu (Red starch) au fost procurate de la Megazyme International Ireland Ltd., Irlanda.

Metode de analiză

- Metode de izolare, întreținere și conservare a culturilor pure de bacterii aparținând genului *Streptomyces* spp.
- Metode clasice și moderne de selecție pentru evidențierea tulpinilor de *Streptomyces* spp. producătoare de hidrolaze
- Tehnici clasice și moderne de evaluare a potențialului enzimatic al tulpinilor selecționate
- Tehnici de evaluare a activității hidrozelor în extractele enzimatice brute

Rezultate și discuții

Izolarea streptomicetelor din habitaturi polare

Au fost izolate și analizate 23 de tulpini de *Streptomyces* spp. izolate din probe de sol și vegetație prelevate din Antarctica de Est și Antarctica de Vest, arealele Munții Grove, Lacul Progress 2 și Insula King George, în anul 2008 (Tabel 5.1).

Tabelul 5.1. Tulpinile de streptomicete izolate din habitaturi polare

Nr.crt	Cod tulpină	Sursa și locul prelevării probei	Data izolării	Caractere culturale
1	Stoc 6K2	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Colonii cu perimetru circular, miceliu aerian de culoare crem, aspect pulverulent
2	Stoc 8K2	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Colonii cu dimensiuni reduse, miceliu aerian de culoare alb, aspect catifelat
3	2K2	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Miceliu aerian de culoare gri, aspect catifelat
4	8K1	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Colonii cu dimensiuni reduse, miceliu aerian de culoare alb, aspect catifelat
5	Stoc 15K	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Colonii cu dimensiuni reduse, miceliu aerian de culoare alb, aspect catifelat
6	STOC 1K	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Miceliu aerian de culoare crem, aspect lucios
7	STOC 27K1A	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Miceliu aerian de culoare alb, aspect catifelat
8	STOC 27K1G	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Miceliu aerian de culoare gri-cenușiu, aspect catifelat
9	3KA	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Miceliu aerian de culoare alb, aspect catifelat

Evaluarea potențialului bacteriilor din biotopul Antarctica privind obținerea de hidrolaze adaptate la temperaturi scăzute

10	3KG	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Miceliu aerian de culoare gri-cenușiu, aspect catifelat
11	5K	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Miceliu aerian de culoare gri-cenușiu, aspect catifelat
12	Stoc 1K	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Colonie cu hife aeriene de culoare alb, aspect pufos
13	P2C4	Vegetație; Lacul Progress 2 (Antarctica de Est)	01.02.08	Colonie extinsă cu miceliu aerian de culoare albă, aspect cretos
14	4 Alga	Vegetație Lacul Progress 2 (Antarctica de Est)	01.02.08	Colonie cu miceliu aerian de culoare alb și aspect cretos
15	STOC 2K1	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Miceliu aerian de culoare alb, aspect catifelat
16	27K3	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	10.01.08	Colonii circulare, miceliu aerian de culoare alb, aspect pufos
17	27K1	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	10.01.08	Colonii circulare, miceliu aerian de culoare alb, aspect pufos
18	33K2G	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Miceliu aerian de culoare gri, aspect catifelat
19	33K2V	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Miceliu aerian de culoare violet-lavandă, aspect pufos
20	33K3G	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Miceliu aerian de culoare gri, aspect catifelat
21	33K3Cc	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Miceliu aerian de culoare crem, aspect pulberulent
22	33K3CI	Sol; Insula King George (Antarctica de Vest)	9.01.08	Miceliu aerian de culoare crem, aspect lucios
23	B2K2	Sol; Munții Grove (Antarctica de Est)	9.01.08	Miceliu aerian de culoare gri, aspect catifelat

Din colecția MIUG au fost utilizate în studiile de selecție tulpinile codificate MIUG 1P, MIUG 6P, MIUG 7P, MIUG 8P, MIUG 11P, MIUG 12P, MIUG 13P. Acestea deși au fost caracterizate în alte studii, s-au utilizat ca etalon și totodată s-a verificat menținerea potențialului de biosinteză a enzimelor prin conservarea streptomicetelor.

Selecția calitativă a tulpinilor de *Streptomyces* spp. producătoare de amilaze și proteaze, active la temperaturi scăzute

La temperatura de 25°C tulpinile nou izolate, din probe de sol și vegetație din zone polare, codificate 3KG, P2C4 și 4 Alga, prezintă activitate proteolitică semnificativă. Tulpinile codate P2C4 și 4 Alga, nou izolate, dar și *Streptomyces* MIUG 11P, MIUG 12P, aparținând Colecției de Microorganisme MIUG prezintă un potențial superior de hidroliză a cazeinei la temperaturi scăzute (5°C) (figura 5.1).

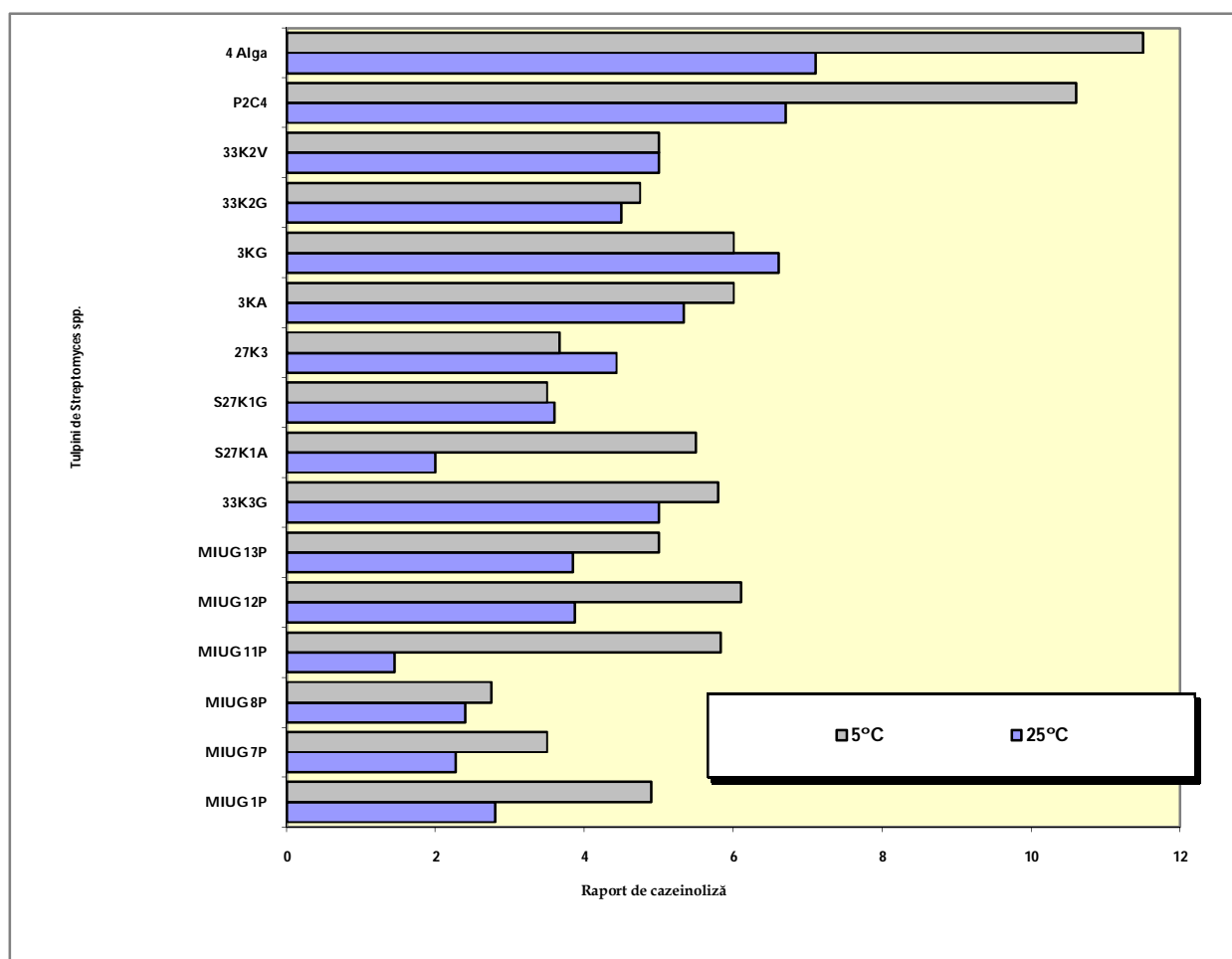


Fig. 5.1. Potențialul streptomicetelor polare de a degrada cazeina, prin cultivare în domenii de temperaturi diferite

Tulpinile codificate 33K2V, P2C4 și 4 Alga (nou izolate din probe de sol și vegetație polară) și MIUG 1P, MIUG 11P, MIUG 12P (din colecția MIUG) au abilități excelente de a hidroliza amidonul la temperatura de 25°C (figura 5.2).

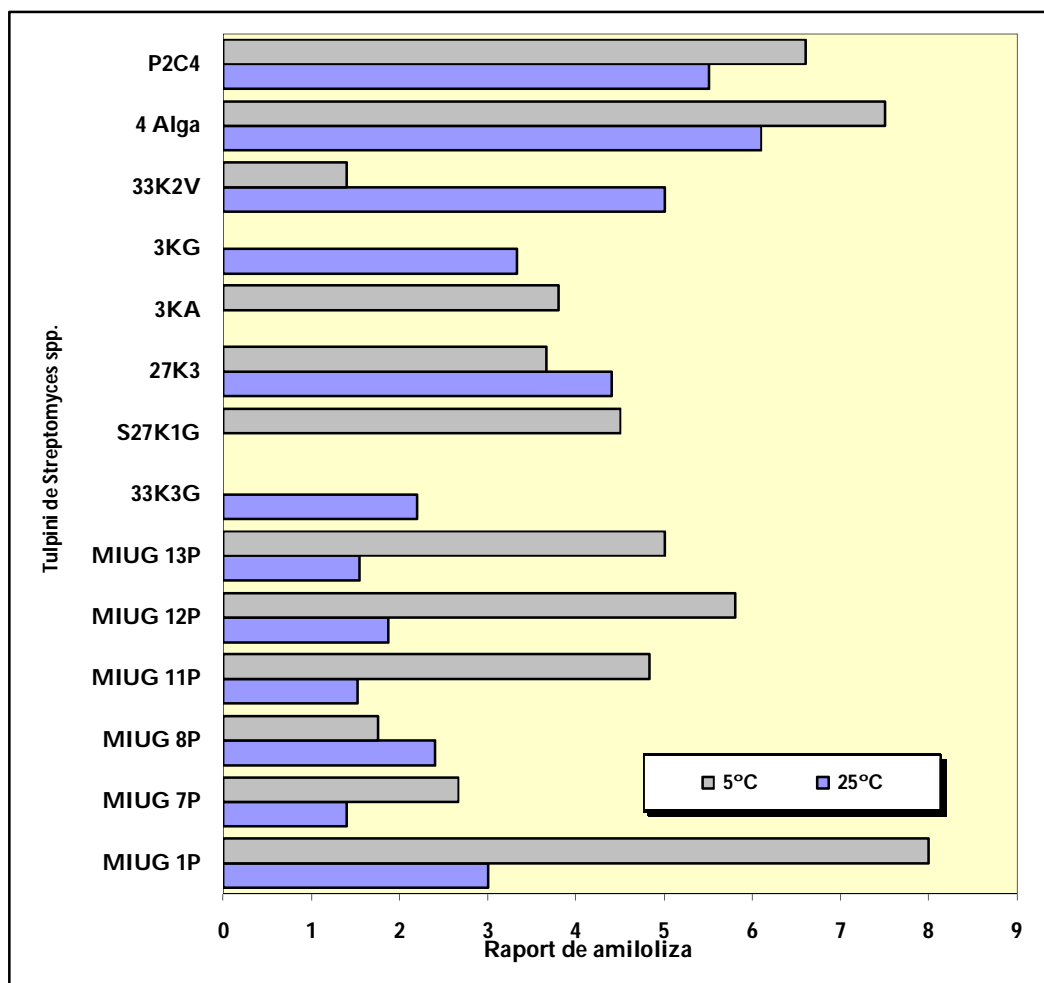


Fig. 5.2. Hidroliza amidonului de către streptomicetele polare prin cultivare la diferite temperaturi

În urma acestui experiment s-a decis selecția tulpinilor codificate *Streptomyces* MIUG 1P, MIUG 11P, MIUG 12P, MIUG 13P (aparținând Colecției de Microorganisme MIUG), dar și tulpinile 4 Alga și P2C4 (tulpini nou izolate din probe de vegetație polară) datorită potențialului lor de a produce enzime hidrolitice, active la temperaturi scăzute.

Tulpinile de *Streptomyces* spp. codificate MIUG 1P, MIUG 11P, și tulpinile nou izolate, P2C4 și 4 Alga sunt capabile să crească și să biosintetizeze enzime amilolitice, active la temperaturi cuprinse între de 15 - 20°C, și la valori de pH cuprins în intervalul 6,0 - 9,0 (tabelul 5.2).

Evaluarea potențialului bacteriilor din biotopul Antarctica privind obținerea de hidrolaze adaptate la temperaturi scăzute

Tabelul 5.2. Evaluarea proprietăților fiziologice ale streptomicetelor polare selecționate prin cultivare pe mediul de cultură bazal îmbogățit cu 0,05% AZCL-Amylose

Tulpini selecționate <i>Streptomyces</i> spp.	Creștere relativă*							
	pH				Temperatura, °C			
	6,0	7,0	8,0	9,0	5	10	15	20
MIUG 1P	+	+	+	+	-	-	-	+
MIUG 11P	+	+	+	+	-	-	-	-
MIUG 12P	+	+	+	+	-	-	+	-
MIUG 13P	+	+	+	+	-	-	-	+
4 Alga	+	+	+	+	-	-	+	+
P2C4	+	+	+	+	-	-	+	+

* – dezvoltare colonială nedetectabilă; + dezvoltare în limite morfologice normale

Majoritatea streptomicetelor polare pot crește și biosintetiza proteaze la valori alcaline de pH dar nu și la temperaturi scăzute (tabelul 5.3). Tulpina *Streptomyces* MIUG 12P, dar și tulpinile nou izolate din probe de vegetație, P2C4 și 4Alga sunt capabile să crească și să biosintetizeze enzime proteolitice, active la valori de pH cuprins în intervalul 6,0 – 9,0 și la temperatura de 20°C.

Tabelul 5.3. Diagnosticarea creșterii streptomicetelor polare selecționate prin cultivare pe mediul de cultură bazal suplimentat cu 0,05% AZCL-Casein

Tulpini selecționate <i>Streptomyces</i> spp.	Creștere relativă*							
	pH				Temperatura, °C			
	6,0	7,0	8,0	9,0	5	10	15	20
MIUG 1P	-	-	+	+	-	-	-	-
MIUG 11P	-	+	+	+	-	-	-	-
MIUG 12P	-	+	+	-	-	-	-	+
MIUG 13P	-	-	-	-	-	-	-	-
4 Alga	+	+	+	+	-	-	+	+
P2C4	+	+	+	+	-	-	-	+

* – dezvoltare colonială nedetectabilă; + dezvoltare în limite morfologice normale

În urma selecției calitative folosind atât metoda clasică de selecție, care a presupus utilizarea amidonului și a cazeinei, ca unice surse de carbon și azot, dar și a metodei moderne care a implicat folosirea substraturilor insolubile cromogene, de tip AZCL, s-a decis studierea tulpinilor *Streptomyces* MIUG 12P, aparținând Colecției de Microorgnisme MIUG, dar și a tulpinilor nou izolate din probe de vegetație din Lacul Progress 2 (Antarctica de Est), P2C4 și 4 Alga, pentru a evidenția proprietățile de a se

dezvolta și a produce amilaze și proteaze, active și la temperaturi scăzute și într-un domeniu larg de pH.

Evaluarea pe criterii cantitative a potențialului streptomicetelor selecționate de a produce hidrolaze active la temperaturi scăzute

Pentru tulpinile selecționate, în preparate enzimatic brută, obținute prin cultivare submersă, pe mediul codificat McS, la 230 rpm, timp de 10 zile, la temperatura de 20°C, s-au testat activitățile enzimatic (alfa și beta amilaze și proteaze), în domeniul de temperatură 5°C-80°C pentru a evalua funcționalitatea enzimelor (figura 5.3 a, b, c).

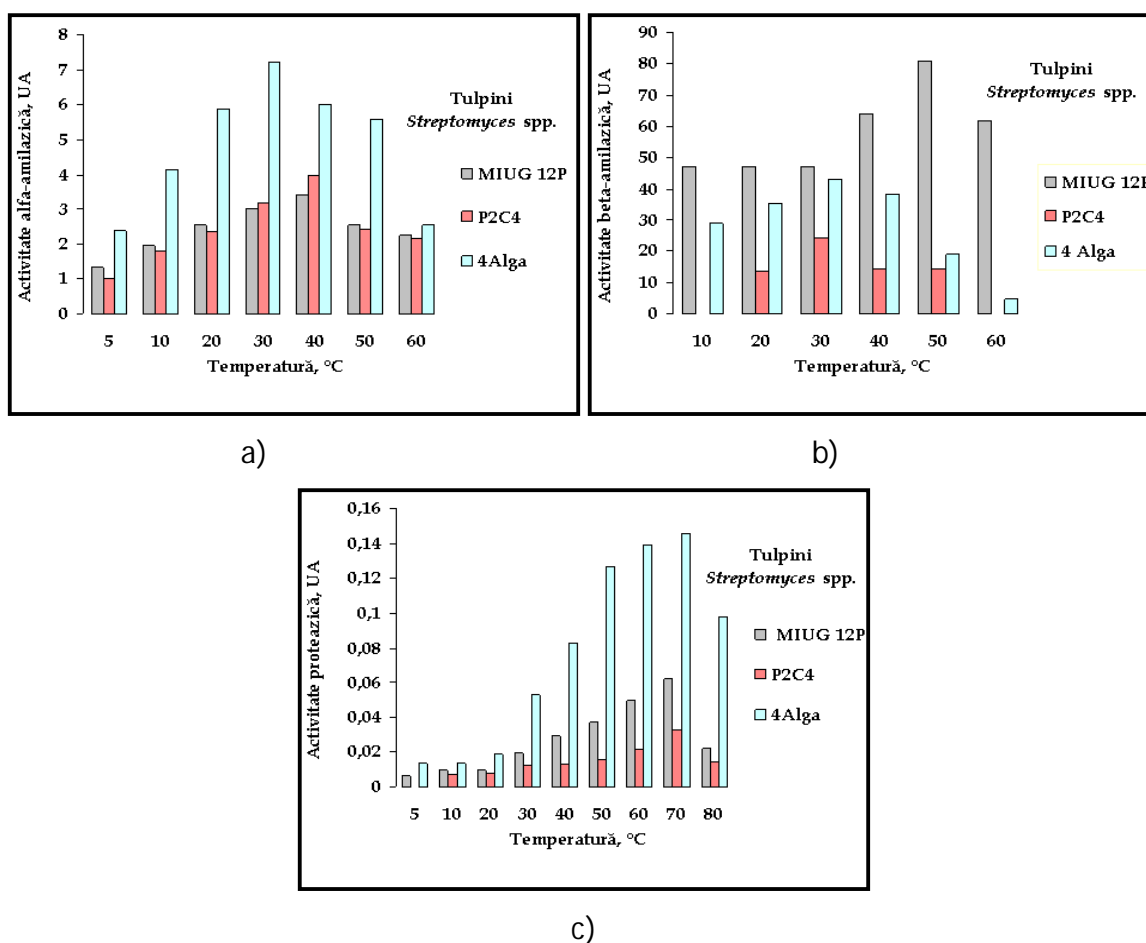


Fig. 5.3. Influența temperaturii asupra activității hidrolazelor sintetizate de tulpinile polare selecționate, a) alfa-amilaza, b) beta-amilaza, c) proteaze

Din analiza datelor experimentale rezultă că tulpinile de streptomicete selecționate sintetizează α -amilaze care acționează optim la temperaturi de 30°C...40°C. Dintre cele trei tulpini selecționate se remarcă tulpina *Streptomyces* 4 Alga care produce α -amilază activă în domeniul de temperatură 5°C...20°C. Această tulpină se remarcă totodată și prin biosinteza de β -amilază activă în domeniul 10°C...20°C, în schimb în

cazul proteazelor enzimele au optimul de activitate la temperaturi superioare 50°C...70°C.

Concluzii parțiale

- ✓ Au fost studiate 30 de tulpini de *Streptomyces* spp. izolate din probe de sol și vegetație prelevate din Antarctica de Est și Antarctica de Vest, dintre care 23 de tulpini de streptomicete nou izolate, în anul 2008, din probe de sol și vegetație din Munții Grove, Lacul Progress 2 și Insula King George și 7 tulpini de streptomicete aparținând colecției laboratorului de Microbiologie al Universității "Dunărea de Jos" din Galați (indicativ MIUG), conservate prin păstrare sub ulei de parafină steril.
- ✓ Selecția calitativă a tulpinilor de streptomicete polare, prin cultivare pe medii cu substraturi cromogene insolubile, a permis creșterea eficienței selecției de tulpini activ producătoare de enzime încă din prima etapă de selecție, aceasta fiind o tehnică modernă simplă, rapidă și specifică pentru studiul unui număr mare de tulpini de streptomicete.
- ✓ Evidențierea producerii de amilaze s-a confirmat prin tehnica rapidă de hidroliză a substratului cromogen solubil (red starch), care a permis identificarea pe criterii semicantitative a potențialului tulpinilor active.
- ✓ Au fost selecționate două tulpini active, *Streptomyces* 4 Alga și *Streptomyces* P2C4, dintre culturile nou izolate și tulpina *Streptomyces* MIUG 12P din colecția Platformei Bioaliment, ca tulpini psihrotrofe capabile să crească și să sintetizeze hidrolaze la temperaturi scăzute.
- ✓ Aceste proprietăți ale hidrolazelor sintetizate de streptomicetele polare selecționate le recomandă pentru aplicații în procese de bioremediere, în industria alimentară și industria detergenților, care operează la temperaturi scăzute.

6. Caracterizarea biochimică și genetică a tulpinilor selecționate de streptomicete polare

Microorganisme

Tulpinile selecționate *Streptomyces* 4 Alga, *Streptomyces* P2C4 și *Streptomyces* MIUG 12P, conservate în ultrafreezer, la temperatura de -70°C, folosind ca agent de crioconservare 15% glicerol.

Vectori de clonare

Pentru experimentele de transformare s-a folosit vectorul pCR.2.1 ce exprimă gene marker pentru rezistență la kanamicină și ampicilină.

Kituri de analiză

Denumire kit	Firmă producătoare	Scopul utilizării
Power Soil™	MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA 92010	Izolare ADN
FastDNA®	Qbiogene, Danemarca	Izolare ADN
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen, Danemarca	Purificare ADN
Setting up the TOPO ^R Cloning Reaction	Invitrogen, Danemarca	Experimente de clonare
Transforming One Shot ^R DH5α™ – T1 ^R , TOP10, and TOP10F Competent Cells	Invitrogen, Danemarca	Experimente de transformare

Programe

- ✓ Finch TV (Geospiza, Inc. Seattle, SUA)
- ✓ CLC Main Workbench 5.1 (CLC bio, Danemarca)

Metode de analiză

- Metoda Biolog pentru caracterizarea biochimică
- Tehnici de caracterizare filogenetică a tulpinilor de streptomicete polare selecționate

Rezultate și discuții

Caracterizarea biochimică a tulpinilor selecționate de streptomicete polare

Deși taxonomiștii au acordat o mare atenție studiului streptomicetelor, caracterizarea și identificarea lor creează încă serioase probleme datorită complexității caracterelor morfologice și fiziologice ale acestora.

Pentru caracterizarea și identificarea speciilor genului *Streptomyces* literatura de specialitate oferă numeroase date fără a avea pretenția că au fost epuizate toate criteriile taxonomice, în realitate însă existând numeroase suprapuneri de caractere, mai ales la nivel de specii sau subspecie.

Proprietățile biochimice ale tulpinilor de streptomicete selecționate, codificate 4 Alga, P2C4 și MIUG 12P, privind capacitatea de a metaboliza diferite substraturi

cu carbon au fost stabilite folosind plăcile de titrare Biolog. Prin utilizarea plăcilor de titrare Biolog se evidențiază capacitatea tulpinilor selecționate de a metaboliza o gamă variată de surse de carbon.

Caracterizarea genetică a tulpinilor selecționate

Izolarea ADN-ului cromozomal (ADNcr)

Au fost studiate diferite metode de extracție a ADN-ului cromozomal din tulpinile polare selecționate.

La tulpina *Streptomyces* 4 Alga a fost obținută o concentrație de ADN extras de $3,46 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ și un raport, A260/A280, de 0,73. În schimb, pentru tulpinile codificate MIUG 12P și P2C4 s-au înregistrat concentrații de ADN cromozomal de $6,84 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ și respectiv, $3,88 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, iar raportul A260/A280 a fost de 1,18 și respectiv, 1,36.

S-au obținut raporturi A260/A230 mai mici de 2,2 pentru toate cele trei tulpini de streptomicete studiate. Astfel, în cazul tulpinii *Streptomyces* MIUG 12P s-a obținut un raport A260/A230 de 0,78 ceea ce indică un grad ridicat de contaminare proteică a ADN-ului izolat.

Întrucât în urma aprecierilor spectrofotometrice dar și electroforetice concentrația și puritatea ADN-ului extras nu au fost adecvate pentru a susține ulterioare tehnici de biologie moleculară, a fost realizată secvențierea ARNr 16S.

Determinarea spectrofotometrică a purității ADN-ului plasmidial recombinat

După izolarea plasmidelor recombinante (purtătoare ale clonelor ce conțin genele ce codifică ARNr 16S de la *Streptomyces* 4 Alga, *Streptomyces* P2C4 și *Streptomyces* MIUG 12P) din transformanții de *E. coli*, au fost evaluați parametri: concentrație și puritate (tabelul 6.1). Se poate observa că au fost înregistrate concentrații cuprinse între $301,58 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ și $411,06 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, și un raport A260/A280 cuprins între 1,86–1,90, pentru cei patru transformanți ai tulpinii *Streptomyces* 4 Alga.

Tabelul 6.1. Identificarea spectrofotometrică a purității și a integrității ADN-ului plasmidial

<i>Streptomyces</i> spp.	Clone	Concentrație ADN, $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	Densitate optică		Raport	
			260 nm	280nm	A260/A280	A260/A230
4 Alga	1.1	346,95	6,939	3,658	1,90	2,31
	1.2	411,06	8,221	4,423	1,86	2,29
	1.3	327,19	6,544	3,492	1,87	2,29
	1.4	301,58	6,032	3,201	1,88	2,31
P2C4	2.1	330,60	6,612	3,516	1,88	2,30

Evaluarea potențialului bacteriilor din biotopul Antarctica privind obținerea de hidrolaze adaptate la temperaturi scăzute

MIUG 12P	2.2	384,81	7,696	4,133	1,88	2,29
	2.3	404,99	8,100	4,369	1,86	2,27
	2.4	337,70	6,754	3,584	1,85	2,28
	3.1	370,57	7,411	3,966	1,88	2,29
	3.2	404,30	8,086	4,372	1,87	2,27
	3.3	363,55	7,271	3,857	1,85	2,23
	3.4	336,09	6,722	3,585	1,88	2,30

Datele obținute confirmă că etapele de clonare, transformare și purificare și-au atins scopul și anume acela de a obține ADN plasmidial cu puritate ridicată necesar secvențierii genice și, în final, identificării filogenetice a tulpinilor selecționate de streptomicete polare.

Din datele prezentate în tabelul 6.1 se poate observa un raport A260/A230 cuprins între 2,23 și 2,31, pentru toți transformanții studiați, ceea ce indică un grad scăzut de contaminare proteică a ADN-ului plasmidial.

Analiza electroforetică a ADN-ului plasmidial

Prođușii de transformare au fost vizualizați în gel de agaroză 0,8% (figura 6.1).

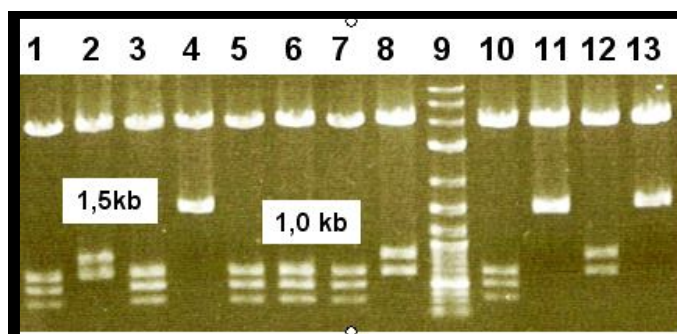


Fig. 6.1. Electroforeza în gel de agaroză a produșilor de transformare; 1-4: ADN plasmidial de la tulpina *Streptomyces 4 Alga*; 5-8: ADN plasmidial de la tulpina *Streptomyces P2C4*; 9: marker molecular; 10-13: ADN plasmidial de la tulpina *Streptomyces MIUG 12P*

Conform datelor prezentate în figura 6.1. se poate observa că prin digestia ADN-ului cu enzima de restricție EcoRI s-au format, pentru fiecare tulpină selecționată, ampliconi cu greutate moleculară corespunzătoare valorii de 1500 pb, specifici genei ARNr 16S.

Analiza filogenetică a tulpinilor polare selecționate

Analiza Blast comparativă a secvențelor nucleotidice corespunzătoare genelor ce codifică ARNr 16S la tulpinile *Streptomyces MIUG 12P*, *Streptomyces P2C4* și *Streptomyces 4 Alga*, izolate și selecționate, a demonstrat un grad ridicat de similaritate, aproximativ 99%. Astfel, *Streptomyces 4 Alga* este foarte asemănătoare cu *Streptomyces P2C4* (99,80%) și *Streptomyces MIUG 12P* (99,60%).

Astfel, tulpinile izolate și selecționate sunt similare, în proporție de 99%, cu *Streptomyces flavofungini*.

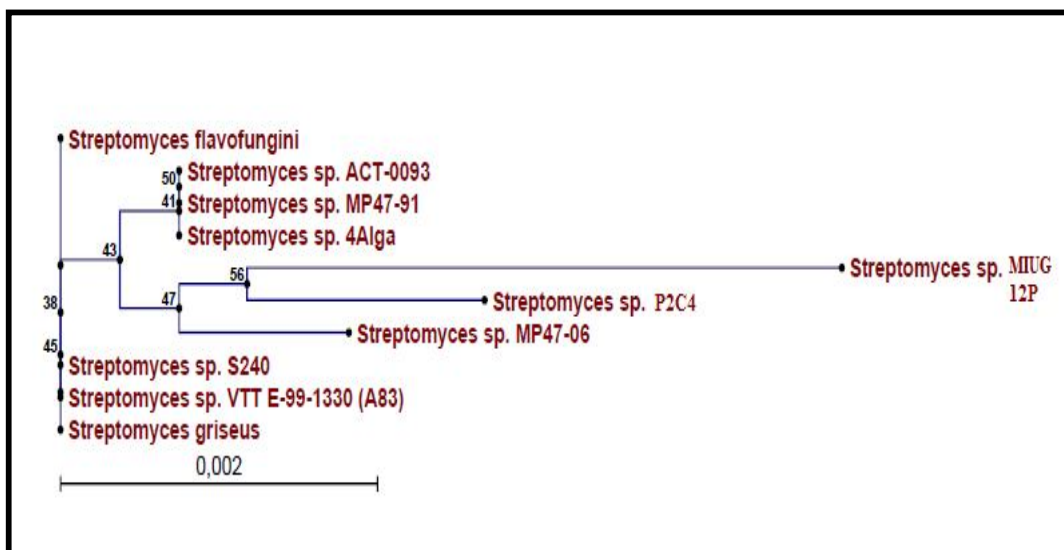


Fig. 6.2. Dendrograma bazată pe analiza ARNr 16S prezentând distanța dintre cele trei tulpini de streptomicete selecționate

Comparând secvențele analizate cu cele existente în baza publică de date BLAST s-au evidențiat similarități în proporție 99-100% cu secvențele de ADN aparținând bacteriilor din genul *Streptomyces* (figura 6.2.).

Tabelul 6.2. Secvențe de gene ale tulpinilor polare de streptomicete selecționate similare cu alte tulpini de *Streptomyces* spp., conform bazei de date GenBank/EMBL/DBJ

Tulpini <i>Streptomyces</i> spp.	Grad de similaritate									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Streptomyces 4 Alga		99,9 3	99,9 3	99,9 3	99,9 3	100, 0	100, 0	99,8 0	99,8 0	99,6 0
EF571003	99,93		100, 0	100, 0	100, 0	99,9 3	99,9 3	99,8 7	99,7 3	99,5 3
EF571002	99,93	100, 0		100, 0	100, 0	99,9 3	99,9 3	99,8 7	99,7 3	99,5 3
AF429394	99,93	100, 0	100, 0		100, 0	99,9 3	99,9 3	99,8 7	99,7 3	99,5 3
EU443837	99,93	100, 0	100, 0	100, 0		99,9 3	99,9 3	99,8 7	99,7 3	99,5 3
EU263063	100,0	99,9	99,9	99,9	99,9		100, 0	99,8	99,8	99,6

Evaluarea potențialului bacteriilor din biotopul Antarctica privind obținerea de hidrolaze adaptate la temperaturi scăzute

	0	3	3	3	3		0	0	0	0
GQ92453	100,0	99,9	99,9	99,9	99,9	100,0		99,8	99,8	99,6
	0	3	3	3	3	0		0	0	0
EU263062.1	99,80	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8		99,7	99,5
		7	7	7	7	0	0		3	3
Streptomyces P2C4	99,80	99,7	99,7	99,7	99,7	99,8	99,8	99,7		99,5
		3	3	3	3	0	0	3		3
Streptomyces MIUG 12P	99,60	99,5	99,5	99,5	99,5	99,6	99,6	99,5	99,5	
		3	3	3	3	0	0	3	3	

Toate cele trei tulpini izolate și selecționate se încadrează în clusterul de taxoni cuprins între *S. griseus* (EF571003) (~45%) și *S. flavofungini* (EF571002) (~50%). *Streptomyces* sp. MP47-91 (EU263063) este tulpina cea mai apropiată din punct de vedere filogenetic de clusterul de tulpini analizate.

Tulpina codificată *Streptomyces* 4 Alga s-a dovedit a fi în proporție de 100% identică cu specii de *Streptomyces* spp. izolate din Norvegia (EU263063) și Insulele Solomon (GQ924533) (tabelul 6.2).

Tehnica de identificare a tulpinilor nou izolate folosind analiza secvențelor genice ale regiunilor ADNr 16S este rapidă și precisă. Această tehnică este importantă pentru identificarea filogenetică a microorganismelor care se dezvoltă greu și în cazul cărora metodele clasice de diagnosticare se realizează greu, sunt costisitoare, iar interpretările sunt subiective, așa cum este cazul streptomicetelor (Ghadin et al., 2008).

Concluzii parțiale

- ✓ Tulpinile polare selecționate, nou izolate din probe de vegetație din Lacul Progress 2, Antarctica, *Streptomyces* 4 Alga, *Streptomyces* P2C4 și tulpina *Streptomyces* MIUG 12P din Colecția MIUG, au fost caracterizate din punct de vedere biochimic și genetic.
- ✓ Proprietățile biochimice ale tulpinilor polare selecționate au fost analizate aplicând testul Biolog. S-a demonstrat că tulpinile selecționate, *Streptomyces* 4 Alga, *Streptomyces* P2C4 și tulpina *Streptomyces* MIUG 12P sunt capabile să metabolizeze o gamă largă de substraturi cu carbon.
- ✓ Au fost studiate diverse metode de separare a ADN-ului cromozomal din tulpinile polare selecționate. Metoda cu microunde și kitul FastDNA® nu sunt adecvate pentru extracția ADN-ului la streptomicetele polare studiate. Concentrații adecvate de ADN și o puritate corespunzătoare au fost obținute cu ajutorul kitului PowerSoil™.

- ✓ Pentru identificarea filogenetică a tulpinilor selecționate a fost accesată baza de date BLAST, și de asemenea au fost utilizate programele Finch TV (Geospiza, Inc. Seattle, SUA) și CLC Main Workbench 5.1 (CLC bio, Danemarca).
- ✓ Tulpina *Streptomyces* 4 Alga s-a dovedit a fi în proporție de 100% identică cu specii de *Streptomyces* spp. izolate din Norvegia și Insulele Solomon. *Streptomyces* 4 Alga este, de asemenea, asemănătoare, din punct de vedere filogenetic, cu tulpina *Streptomyces* P2C4 (99,53%) și tulpina *Streptomyces* MIUG 12P (99,53%).
- ✓ Tulpina *Streptomyces* 4 Alga va constitui tulpina de referință în studiile ulterioare privind optimizarea condițiilor fermentative, în scopul obținerii de randamente maxime de amilaze și proteaze, active la temperaturi scăzute, precum și evaluarea condițiilor fizico-chimice de acțiune a hidrolazelor în preparate brute și purificate.

7. Optimizarea compoziției mediilor fermentative pentru controlul sintezei hidrolazelor din complexul enzimatic

Microorganism

În studiu s-a utilizat tulpina *Streptomyces* 4 Alga, izolată din probe de vegetație prelevate din Lacul Progress 2 (Antarctica de Est), în anul 2008.

Metode de analiză

- Modelul experimental Plackett-Burman
- Metoda analizei suprafeței de răspuns pentru optimizarea compoziției mediilor fermentative

Rezultate și discuții

Identificarea compușilor chimici semnificativi în procesul de biosinteză a hidrolazelor, active la temperaturi scăzute, folosind modelul experimental Plackett-Burman

Mediile fermentative utilizate pentru biosinteza enzimelor hidrolitice trebuie să conțină în diferite raporturi optime sursa de carbon și sursa de azot, care pot juca și rolul de inductori ai biosintezei enzimelor, precursori, cofactori și microelemente.

Tabelul 7.1. Modelul Plackett-Burman pentru selecția surselor nutritive semnificative care influențează biosinteza hidrolazelor, active la temperaturi scăzute

Evaluarea potențialului bacteriilor din biotopul Antarctica privind obținerea de hidrolaze adaptate la temperaturi scăzute

Variantă experi mentală	Componente chimice în compoziția mediului fermentativ, g%										
	A*	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	2,00	1,25	0,50	1,00	1,00	0,20	0,50	2,00	2,00	3,00	1,00
2	0,75	1,25	1,00	0,50	1,00	0,20	2,00	2,00	2,00	1,00	3,00
3	2,00	0,50	1,00	1,00	0,50	0,20	2,00	5,00	2,00	1,00	1,00
4	0,75	1,25	0,50	1,00	1,00	0,10	2,00	5,00	5,00	1,00	1,00
5	0,75	0,50	1,00	0,50	1,00	0,20	0,50	5,00	5,00	3,00	1,00
6	0,75	0,50	0,50	1,00	0,50	0,20	2,00	2,00	5,00	3,00	3,00
7	2,00	0,50	0,50	0,50	1,00	0,10	2,00	5,00	2,00	3,00	3,00
8	2,00	1,25	0,50	0,50	0,50	0,20	0,50	5,00	5,00	1,00	3,00
9	2,00	1,25	1,00	0,50	0,50	0,10	2,00	2,00	5,00	3,00	1,00
10	0,75	1,25	1,00	1,00	0,50	0,10	0,50	5,00	2,00	3,00	3,00
11	2,00	0,50	1,00	1,00	1,00	0,10	0,50	2,00	5,00	1,00	3,00
12	0,75	0,50	0,50	0,50	0,50	0,10	0,50	2,00	2,00	1,00	1,00

*A-amidon, B-glicerol, C-maltoză, D-extract de malt, E-glucoză, F-uree, G-cazeinat de sodiu, H-extract de drojdie, I-peptonă, J-clorură de calciu, K-clorură de potasiu

În acord cu aceste date din literatură, studiile de optimizare a mediilor de biosinteză pentru tulpina selecționată *Streptomyces 4 Alga* au vizat evaluarea efectului calitativ și cantitativ a unsprezece componente chimice cu rol de surse de carbon, azot și minerale. Influența celor unsprezece factori (amidon, glicerol, maltoză, extract de malt, glucoză, uree, cazeinat de sodiu, extract de drojdie, peptonă, clorură de calciu și clorură de potasiu) asupra biosintezei de amilaze și proteaze a fost investigată folosind modelul Plackett-Burman (tabelul 7.1).

Conform analizei statistice, pentru biosinteza alfa-amilazei cu tulpina *Streptomyces 4 Alga*, variabilele importante s-au dovedit a fi clorura de calciu și extractul de drojdie. Concentrația de glicerol, concentrația de amidon și concentrația de extract de drojdie influențează randamentul de biosinteză a beta-amilzei. În schimb randamentul de biosinteză a proteazelor este influențat de concentrația de extract de malt, concentrația de cazeinat de sodiu și concentrația de uree.

Optimizarea compoziției mediilor fermentative folosind metoda suprafeței de răspuns

Modelul compoziției centrale cu două variabile independente (concentrația de extract de drojdie și concentrația de clorură de calciu), codificate pe cinci niveluri de variație (- α , -1, 0, +1, + α) și 11 experimente a fost utilizat pentru optimizarea concentrațiilor variabilelor care s-au dovedit a influența pozitiv procesul de sinteză a alfa-amilazei, activă la temperaturi scăzute, cu *Streptomyces 4 Alga*.

Diagrama suprafeței de răspuns precum și diagrama de contur (figura 7.1)

evidențiază valorile optime ale variabilelor independente (concentrația de extract de drojdie și de clorură de calciu) pentru care se înregistrează randamente superioare de biosinteză a alfa-amilazei, activă la temperaturi scăzute. Prin urmare, menținerea concentrației la valoare minimă, și anume 5,00 g% extract de drojdie și 0,25 g% clorură de calciu se obține biosinteza maximă de alfa-amilază (11,2875 UA).

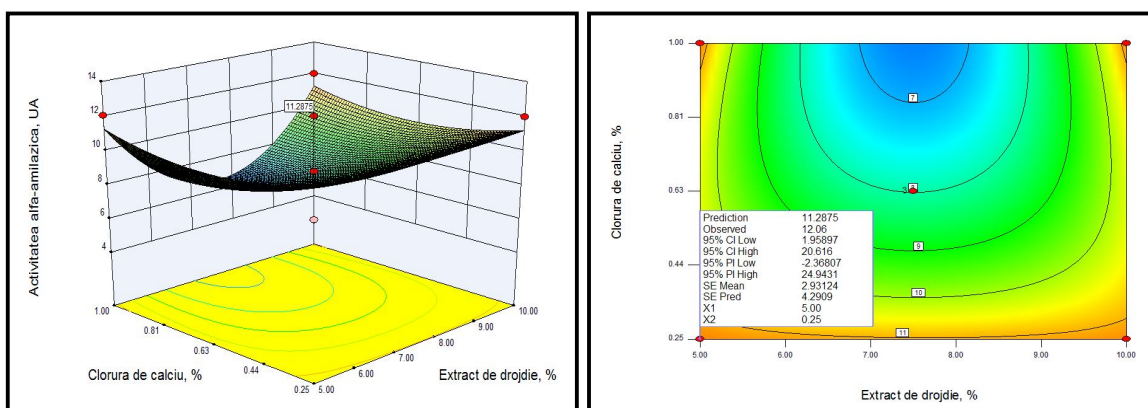
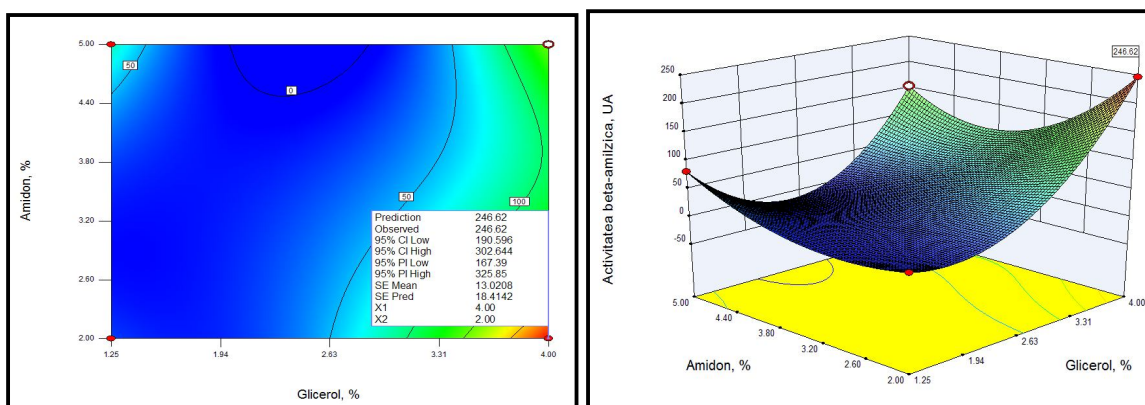


Fig. 7.1. Diagrama suprafeței de răspuns (stânga) și graficul de contur (dreapta) ce descriu efectele cantitative, corelative ale clorurii de calciu, g% și extractului de drojdie, g% asupra randamentului de biosinteză a alfa-amilazei la *Streptomyces 4 Alga*

Modelul compoziției centrale cu trei variabile independente (concentrația de glicerol, amidon și extract de drojdie), codificate pe cinci niveluri de variație ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$) și 17 experimente a fost utilizat pentru optimizarea compoziției mediului fermentativ pentru biosinteza beta-amilazei, activă la temperaturi scăzute, cu tulpina *Streptomyces 4 Alga*. Mediul de referință a fost constituit din (g%): maltoză 0,50, extract de malț 0,50, glucoză 1,00, uree 0,20, cazeinat de sodiu 0,50, peptonă 3,46, clorură de calciu 3,00 și clorură de potasiu 3,00, pH=7,0.



a)

Evaluarea potențialului bacteriilor din biotopul Antarctica privind obținerea de hidrolaze adaptate la temperaturi scăzute

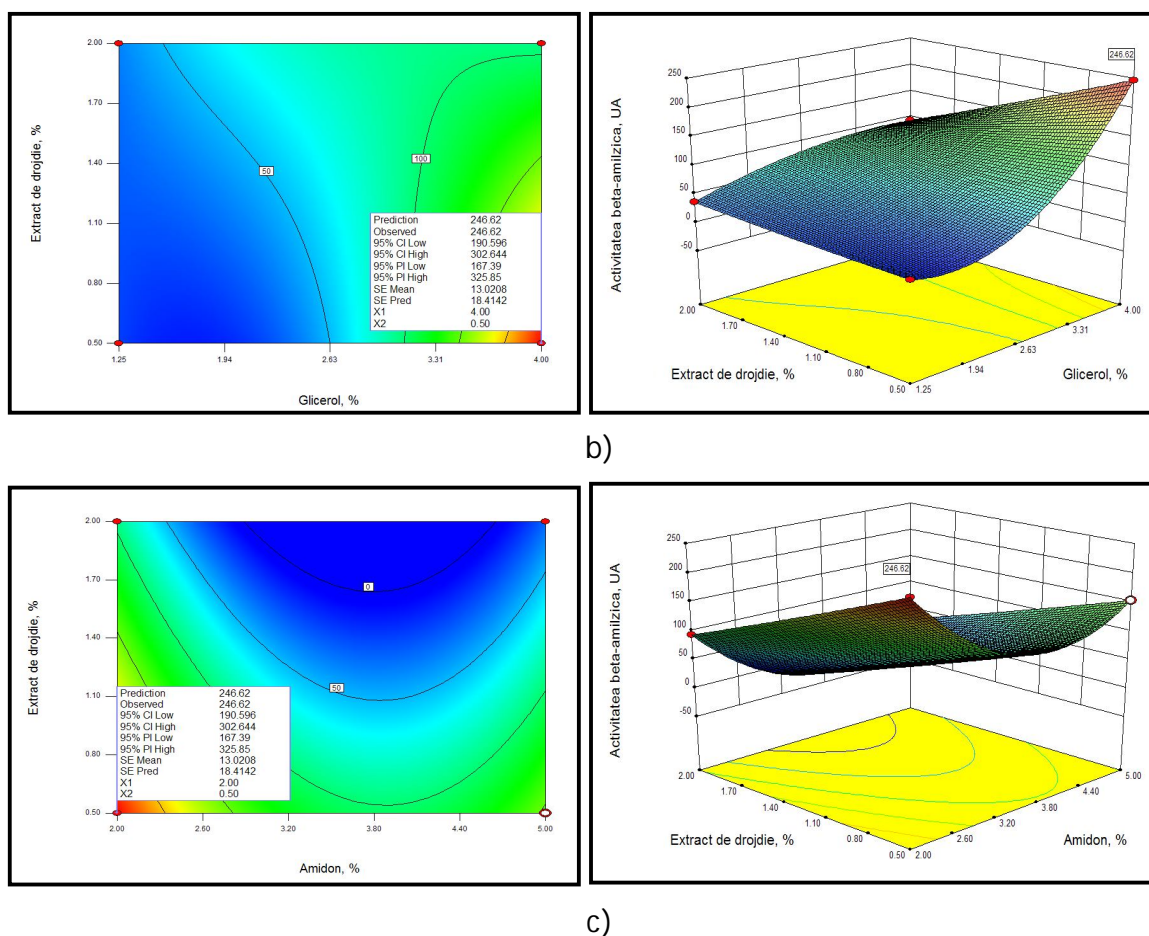


Fig.7.2. Diagramele suprafețelor de răspuns (dreapta) și graficele de contur (stânga) ce descriu efectele cantitative, corelative ale amidonului, g% și glicerolului, g% (a), glicerolului, g% și extractului de drojdie, g% (b), amidonului, g% și extractului de drojdie, g% (c) asupra randamentului de biosinteză a beta-amilazei la *Streptomyces 4 Alga*

Rezultatele studiului de modelare statistică a bioproducerii de beta-amilază cu tulpina psihrotrofă *Streptomyces 4 Alga* au permis identificarea valorilor optime ale concentrațiilor celor trei componente cu influență esențială asupra randamentului de biosinteză și anume: 2,00 g% amidon, 4,00 g% glicerol și 0,5% extract de drojdie (figura 7.2). În aceste condiții biotehnologice se configurează un randament sporit de biosinteză a beta-amilazei, la valoarea maximă predicționată de model de 246,62 UA.

Modelul compoziției centrale cu trei variabile independente (concentrația de extract de malt, de cazeinat de sodiu și de uree) a fost utilizat și pentru optimizarea mediului fermentativ pentru biosinteza de proteaze, active la temperaturi scăzute, cu *Streptomyces 4 Alga*. Parametrii considerați nesemnificativi, optimizați numeric cu ajutorul programului Design Expert, au

constituit mediul de bază și anume (g%): amidon 0,75, glicerol 0,5, maltoză 0,5, glucoză 0,5, extract de drojdie 5,0, peptonă 5,0, clorură de calciu 2,0 și clorură de potasiu 1,0.

În condițiile biotehnologice testate, randamente superioare de biosinteză a proteazelor, active la temperaturi scăzute, cu *Streptomyces 4 Alga*, se obțin în medii cu 4,00 % extract de malț, 2,00 % cazeinat de sodiu și 0,20 % uree (figura 7.3).

Analizând condițiile biotehnologice pentru biosinteza enzimelor hidrolitice din complexul enzimatic, rezultă că proporția dintre cele trei tipuri de enzime, α -amilază, β -amilază și proteaze, poate fi controlată modificând, în mediul fermentativ, concentrația unor ingrediente esențiale pentru creșterea și înmulțirea celulelor și biosinteza enzimelor (tabelul 7.2).

Tabelul 7.2. Compoziția mediilor fermentative optimizate pentru biosinteza de hidrolaze, active la temperaturi scăzute, cu tulpina *Streptomyces 4 Alga*

Compus chimic	Concentrație, g%		
	Mediul optimizat pentru biosinteza alfa-amilazei	Mediul optimizat pentru biosinteza beta-amilazei	Mediul optimizat pentru biosinteza proteazelor
Amidon	0,75	2,00	0,75
Glicerol	0,88	4,00	0,50
Maltoză	0,77	0,50	0,50
Extract de malț	0,78	0,50	4,00
Glucoză	1,00	1,00	0,50
Uree	0,14	0,20	0,20
Cazeinat de sodiu	2,00	0,50	2,00
Extract de drojdie	5,00	0,5	5,00
Peptonă	4,65	3,46	5,00
Clorură de calciu	0,25	3,00	2,00
Clorură de potasiu	1,00	3,00	1,00

Evaluarea potențialului bacteriilor din biotopul Antarctica privind obținerea de hidrolaze adaptate la temperaturi scăzute

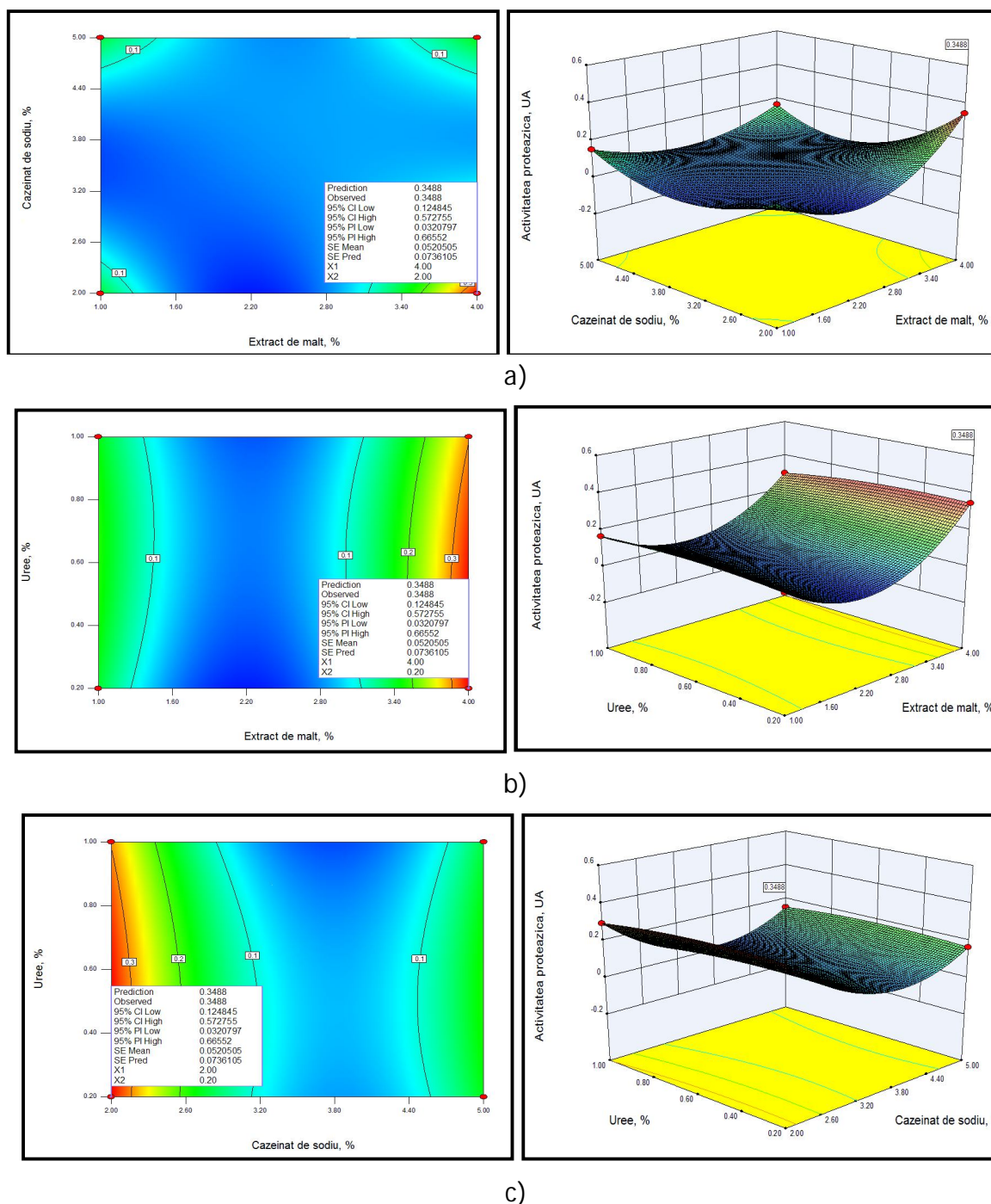


Fig. 7.3. Diagramele suprafețelor de răspuns (dreapta) și graficele de contur (stânga) ce descriu efectele cantitative, corelative ale extractului de malt, g% și cazeinatului de sodiu, g% (a), ureei, g% și extractului de malt, g% (b), ureei, g% și cazeinatului de sodiu, g% (c) asupra randamentului de biosinteză a proteazelor la *Streptomyces 4 Alga*

Pentru a valida modele matematice au fost transpuse condițiile biotehnologice în laborator, în condițiile predicționate de model (Kar și Ray, 2008). Valorile experimentale au fost apropiate de rezultatele predicționate de model ceea ce confirmă fidelitatea rezultatelor obținute.

Concluzii parțiale

- ✓ S-a studiat efectul calitativ și cantitativ, și s-a optimizat concentrația unor ingrediente din compoziția mediilor fermentative, esențiale pentru biosinteza de amilaze și proteaze, active la temperaturi scăzute, cu tulpina psihrotrofă selecționată, *Streptomyces 4 Alga*, în condiții de laborator, în sistem submers.
- ✓ Modelul experimental Plackett-Burman a oferit informații privind relevanța factorilor analizați asupra biosintezei enzimelor din complexul hidrolazic. Astfel s-a demonstrat că extractul de drojdie și clorura de calciu sunt factori semnificativi în biosinteza alfa-amilazei, amidonul, glicerolul și extractul de drojdie manifestă o influență semnificativă asupra bioproducerii de beta-amilază, iar biosinteza de proteaze, active la temperaturi scăzute, este semnificativ influențată de concentrația de extract de malț, cazeinat de sodiu și uree din compoziția mediului fermentativ.
- ✓ În condițiile biotehnologice testate randamente sporite de α -amilază se obțin în medii cu 5,00% extract de drojdie și 0,25% clorură de calciu, cu o creștere a randamentului de enzimă de 4,4 ori față de producția de enzimă înregistrată pe mediul de cultură neoptimizat.
- ✓ Biosinteza β -amilazei este stimulată în prezență de 2,00% amidon, 4,00% glicerol și 0,5% extract de drojdie. În aceste condiții activitatea beta-amilazică a fost de 2,4 ori mai mare comparativ cu condițiile neoptimizate.
- ✓ Pentru biosinteza maximă de proteaze, active la temperaturi scăzute, cu tulpina selecționată, *Streptomyces 4 Alga* rezultate semnificativ îmbunătățite se obțin în medii cu 4,00% extract de malț, 2,00% cazeinat de sodiu și 0,20% uree. În aceste condiții optimizate randamentul de biosinteză a enzimelor proteolitice s-a îmbunătățit substanțial, totodată reducându-se și durata de cultivare.
- ✓ Datele predicționate prin modelare matematică au fost validate prin experimente realizate în triplicat în condiții de laborator.

8. Evaluarea condițiilor fizico-chimice de acțiune a hidrolazelor sintetizate de tulpina psihrotolerantă, *Streptomyces* 4 alga, în preparate brute și purificate

Microorganism - Tulpina *Streptomyces* 4 Alga, izolată din probe de vegetație prelevate din Lacul Progress 2 (Antarctica de Est), în anul 2008.

Determinări

Determinările au fost realizate în cadrul Departamentului de Agricultură și Ecologie, Facultatea de Științele Vieții, Universitatea din Copenhaga, Danemarca.

Rezultate și discuții

Strategii de purificare

În cultura obținută prin cultivare submersă, timp de 8 zile la temperatura de 20°C s-a adăugat inhibitor proteazic, apoi s-a separat biomasa prin centrifugare la 9000 rpm și la temperatura de 4°C, timp de 15 minute. Schematic protocolul de purificare este prezentat în figura 8.1.

O cantitate mare de alfa-amilază a fost separată în primele fracțiuni colectate prin eluție de pe coloana de schimb anionic, ceea ce indică faptul că alfa-amilaza are comportament similar cu moleculele neutre sau alcaline și nu sunt adsorbite de faza staționară (rășina anionică) (figura 8.2).

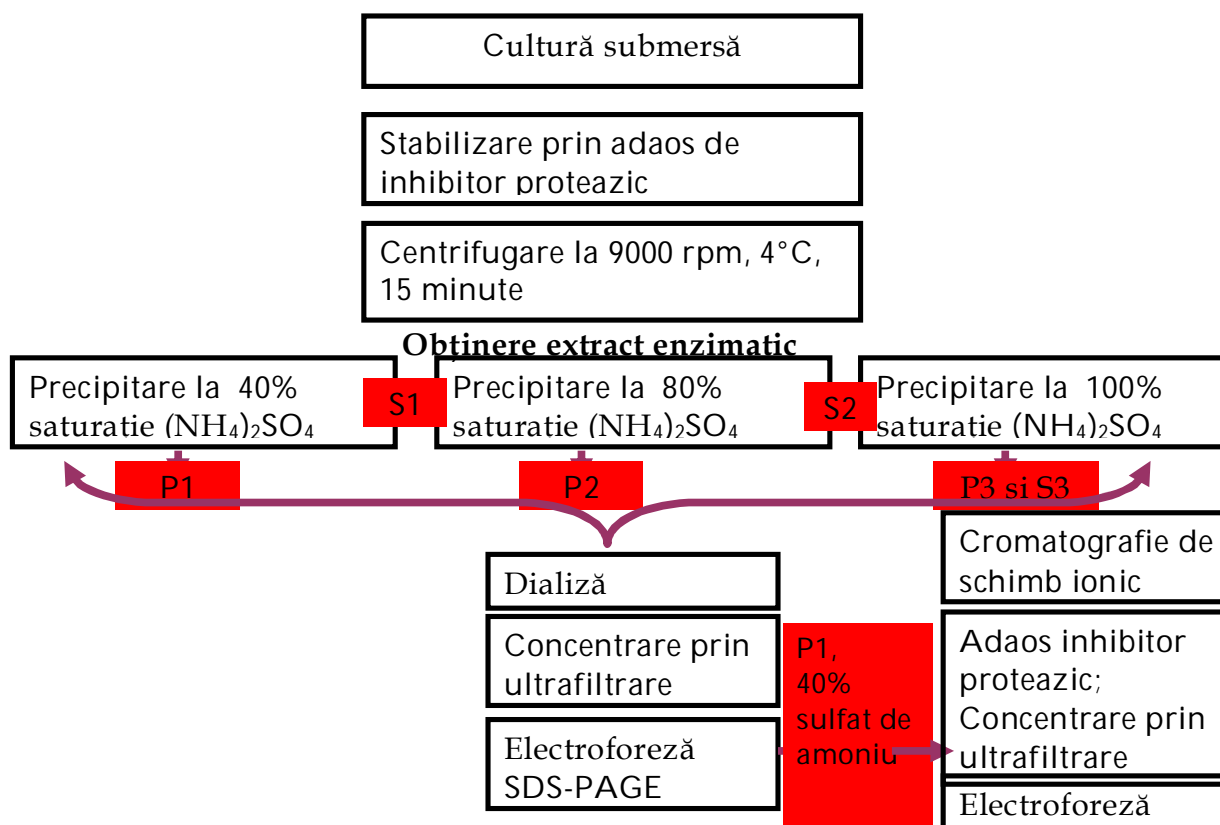


Fig. 8.1. Protocolul adoptat pentru purificarea alfa-amilazei

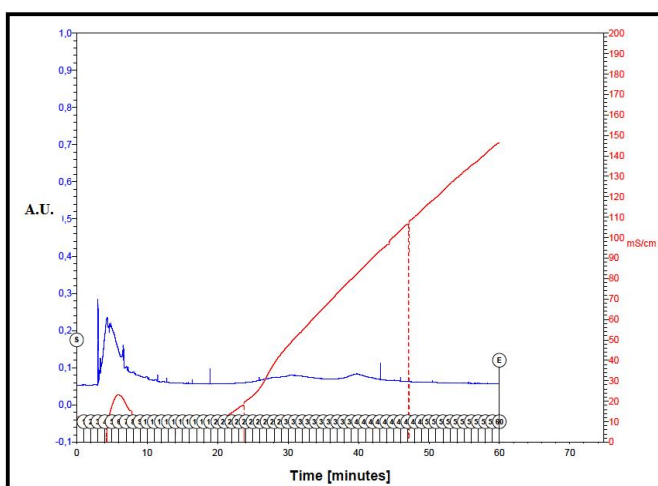


Fig. 8.2. Profilul cromatografiei de schimb ionic ($\lambda=280/254$ nm) a fracțiunii proteice obținute prin precipitarea extractului brut la 40 % saturație sulfat de amoniu și dializă

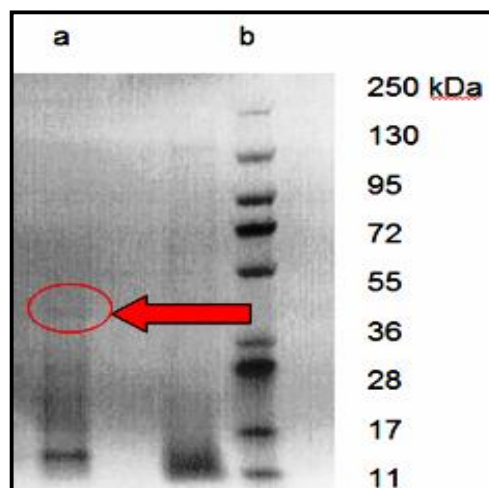


Fig. 8.3. Determinarea masei moleculare a alfa-amilazei sintetizată de tulpina *Streptomyces* 4 Alga prin SDS-PAGE; a) fracțiuni active cumulate; b) proteine standard

În gelul de poliacrilamidă se observă prezența a trei benzi, masa moleculară a alfa-amilazei fiind estimată la 45000 Da, celelalte două benzi ar putea corespunde inhibitorului proteazic (15000 Da) și a proteazelor (28000 Da) (figura 8.3). Ipoteza că alfa-amilaza sintetizată de *Streptomyces 4 Alga* este un monomer cu masă moleculară de 45000 Da este în acord cu rezultatele obținute de Petinate et al., 1999 și Dastager et al., 2008 care au descris proteaze cu mase moleculare care variază între 19000 Da și 35000 Da.

Determinarea parametrilor cinetici

Determinarea constantei Michaelis-Menten a fost posibilă prin reprezentarea grafică a vitezei maxime de reacție ($1/V$) și a concentrației de substrat ($1/S$) utilizând metoda Lineweaver-Burk (Hoque et al., 2006) cu ajutorul programului GraphPad Prism 5.

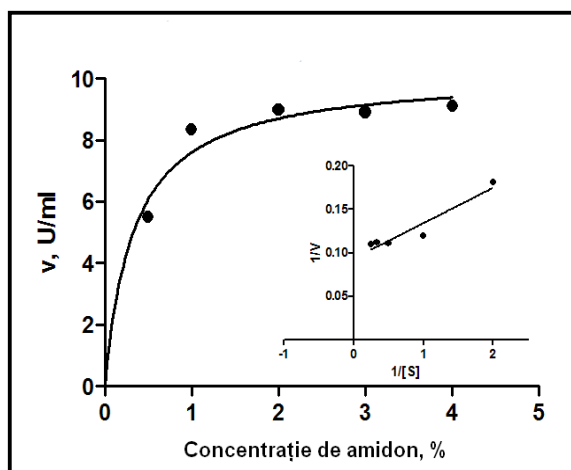


Fig. 8.4. Variația vitezei reacției de hidroliză a substratului amidon, în reprezentările Michaelis - Menten și Lineweaver-Burk

Valoarea K_M pentru alfa-amilaza parțial purificată, pentru substratul specific (amidon) (0,5 - 4%), a fost de 0,3402% (figura 8.4). Pentru substratul specific amidon s-a obținut viteza maximă de reacție, $V_{max} = 10,18$ U/mL. Datele sunt în acord cu alte rezultate descrise în literatură. Alfa-amilaza produsă de o specie nou izolată de *Streptomyces gulbargensis*, stabilă la pH alcalin (pH 8,5 - 11,0), cu temperatura optimă de acțiune situată în jurul valorii de 45°C, a prezentat o valoare a constantei Michaelis-Menten de 5,0 mg·mL⁻¹,

în timp ce amilaze produse de specii de *Bacillus* au prezentat valori ale lui K_M cuprinse între 3,85 și 1,9 mg mL⁻¹ (Syed et al., 2009; Yandri et al., 2010).

Constanta Michaelis-Menten reprezintă un indicator al afinității enzimei pentru substrat, cu cât K_M are o valoare mai mică cu atât afinitatea enzimei pentru substrat este mai ridicată.

Influența agenților reducători, a surfactanților și a ionilor metalici asupra funcționalității alfa-amilazei parțial purificate

Efectul agenților reducători precum și a surfactanților asupra activității amilazice a fost evaluat în prezență de ditionitritol (DTT), 2-mercaptoetanol (2BME), L-glutation (GSH) și etanol în concentrație de 100 mM, prin termostatare la

temperatura de 20°C, timp de 20 minute. Enzima a fost menținută în contact cu substanțele chimice testate în condițiile descrise apoi s-a determinat activitatea enzimatică în condițiile optime de acțiune a enzimei. Ca martor s-a utilizat o probă de enzimă netratată.

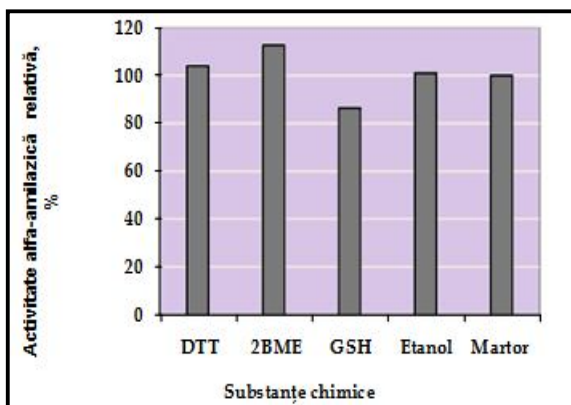


Fig. 8.5. Efectul agenților chimici reducători asupra alfa-amilazei parțial purificată

Ditiotreitol (DTT), L-glutation și etanolul au prezentat un efect minor de inhibiție asupra alfa-amilazei purificate (figura 8.5). În prezență de 2-mercaptoetanol, în concentrație de 100 mM, alfa-amilaza, produsă de *Streptomyces 4 Alga*, suferă un ușor efect de activare (112%).

Se poate observa efectul stimulator al EDTA-ului asupra amilazei purificate, efectul activator crescând odată cu creșterea concentrației de EDTA în limitele 0,1 mM – 10 mM.

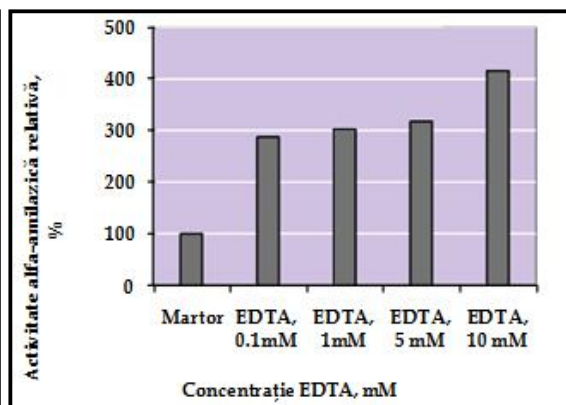


Fig. 8.6. Efectul EDTA-ului asupra alfa-amilazei parțial purificată

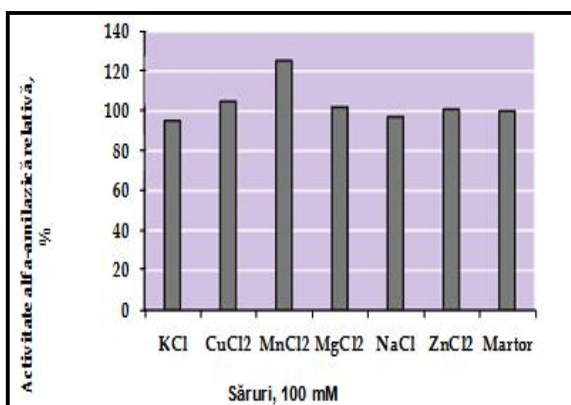


Fig. 8.7. Efectul unor săruri ale ionilor metalici asupra activității alfa-amilazice

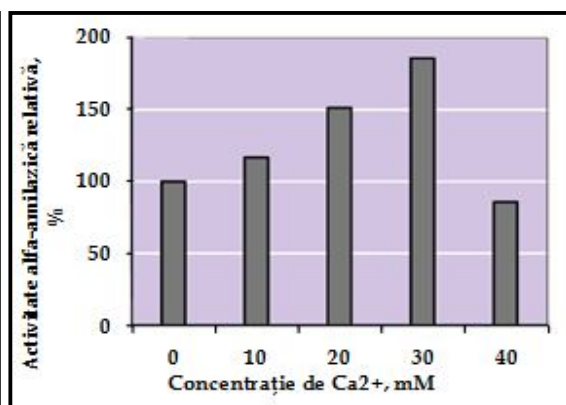


Fig. 8.8. Efectul concentrației de ioni divalenti de Ca²⁺ asupra alfa-amilazei parțial purificată

Activitatea amilazică este stimulată în prezența ionilor divalenți de mangan și cupru (figura 8.7). Amilaza parțial purificată este activată progresiv în prezența ionului de Ca^{2+} la concentrații cuprinse între 20 mM și 30 mM, cunoscut fiind efectul activator și stabilizator al acestuia (Ueda et al., 2008) (figura 8.8). Această afirmație este susținută și de cercetările lui Chakraborty et al., 2009 care a demonstrat că amilaza biosintetizată de *Streptomyces* spp. D1 este stimulată la concentrații de 5 mM și 10 mM Ca^{2+} . La concentrații de 1 mM Ca^{2+} activitatea alfa-amilazei, sintetizată de *Streptomyces gulbargensis* DAS 131 a crescut cu 48% (Syed et al., 2009).

Concluzii parțiale

- ✓ Enzima majoritară în complexul enzimatic este alfa-amilaza; în timp ce beta-amilaza s-a dovedit o enzimă cu instabilitate pronunțată la temperaturi scăzute iar prezența proteazelor în extractul brut este un impediment major, enzimele proteazice contribuind la inactivarea amilazelor.
- ✓ S-a stabilit o strategie de separare și purificare a alfa-amilazei ce cuprinde etape de precipitare cu sulfat de amoniu, dializă, concentrare prin ultrafiltrare și cromatografie de schimb ionic.
- ✓ Masa moleculară a alfa-amilazei determinată prin SDS-PAGE a fost estimată la 45 000 Da.
- ✓ Activitatea amilazică este stimulată în prezența ionilor divalenți de calciu, mangan și cupru.
- ✓ Alfa-amilaza produsă de *Streptomyces* 4 Alga este stabilă față de surfactanți ca Tween 20, Tween 80 și Triton X-100. De asemenea, s-a determinat efectul stimulator al EDTA-ului asupra amilazei purificate, efectul activator crescând odată cu creșterea concentrației de EDTA de la 0,1 mM la 10mM.
- ✓ Pentru alfa-amilaza parțial purificată, valoarea K_M pentru substratul specific amidon a fost de 0,3402 %, iar viteza maximă de reacție, v_{max} a fost de 10,18 U/mL, valori comparabile cu parametrii descriși pentru α -amilaze active la temperaturi scăzute.

CONCLUZII FINALE

Studiile realizate în acord cu obiectivele științifice ale tezei de doctorat au vizat analiza potențialului bacteriilor izolate din habitaturi polare de a biosintetiza hidrolaze, active la temperaturi scăzute, cu aplicații industriale și în bioremediere. Cercetările realizate au condus la formularea unor concluzii generale cu impact în cercetarea fundamentală și aplicativă, după cum urmează:

- ❖ S-au studiat 30 de tulpini de *Streptomyces* spp. izolate din probe de sol și vegetație prelevate din Antarctica de Est și Antarctica de Vest, dintre care 23 de tulpini de streptomicete nou izolate, în anul 2008, din arealele Munților Grove, a lacului Progress 2 și a insulei King George. Un număr de 7 tulpini de streptomicete dintre cele studiate aparțin colecției platformei de cercetare și formare Bioaliment din cadrul Universității "Dunărea de Jos" din Galați (indicativ MIUG).
- ❖ Probele de sol și vegetație din zonele polare au fost obținute prin intermediul Fundației Antarctice Române și a Institutului Român de Cercetări Polare din București, și au fost colectate de dr. ing. Theodor Gheorghe Negoită în timpul expedițiilor în Antarctica.
- ❖ Selecția pe criterii semi-cantitative a tulpinilor de streptomicete polare, activ producătoare de amilaze și proteaze prin cultivare pe medii nutritive, în plăci, cu substraturi cromogene solubile și insolubile, a permis creșterea eficienței selecției încă din prima etapă de selecție, făcând posibil studiul unui număr mare de tulpini de streptomicete aplicând tehnici moderne, simple și rapide.
- ❖ Prin aplicarea etapelor de selecție calitativă și cantitativă au fost evidențiate trei tulpini psihrotrofe, activ producătoare de amilaze și proteaze active la temperaturi scăzute (10°C...20°C) și pH alcalin, *Streptomyces* 4 Alga și *Streptomyces* P2C4, dintre culturile nou izolate și tulpina *Streptomyces* MIUG 12P din colecția Platformei Bioaliment.
- ❖ Cele trei tulpini polare selecționate, *Streptomyces* MIUG 12P, *Streptomyces* 4 Alga și *Streptomyces* P2C4 au fost caracterizate din punct de vedere biochimic și genetic.
- ❖ S-a evaluat efectul calitativ și cantitativ al unor surse nutritive și s-a optimizat compoziția mediilor fermentative pentru controlul biosintezei enzimelor din complexul enzimatic la tulpina psihrotrofă, selecționată, *Streptomyces* 4 Alga utilizând modelul Placket-Burman, modelul compoziției centrale (CCD) și metoda analizei suprafeței de răspuns, folosind programul Design Expert 8.0.2.0.

- ❖ Studiile de optimizare demonstrează posibilitatea controlului raportului de biosinteză a enzimelor din complexul enzimatic prin modificarea compoziției mediului fermentativ și a duratei de cultivare. Acest aspect are importanță practică deosebită în diversificarea gamei de enzime produse cu același agent în condiții biotehnologice controlate.

CONTRIBUȚII LA DEZVOLTAREA CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU ȘI PERSPECTIVE

Teza de doctorat reprezintă un studiu original cu impact de cercetare fundamentală și aplicativă în domeniul biotehnologiei aplicate, privind bioproducerea de enzime, active la temperaturi scăzute, cu tulpini de *Streptomyces* spp. izolate din Antarctica, cu implicații industriale și în bioremediere.

Teza de doctorat aduce o serie de contribuții originale la dezvoltarea cunoașterii în domeniu după cum urmează:

- Au fost izolate din probe de sol și vegetație prelevate din Antarctica, bacterii filamentoase, psihrotrofe, din genul *Streptomyces* spp..
- Au fost selecționate utilizând metode moderne de investigare biochimică tulpini psihrotrofe activ producătoare de amilaze și proteaze, active la temperaturi scăzute. Selecția de streptomicete, adaptate la temperaturi scăzute, folosind substraturile cromogene insolubile și solubile reprezintă reprezentă cercetări abordate în premieră în țara noastră.
- În funcție de proprietățile catalitice demonstrate ale enzimelor studiate (active la temperaturi scăzute și în medii cu pH alcalin), s-a urmărit obținerea de preparate enzimatiche cu implicații în industria detergenților și în bioremediere; studiul enzimelor active la temperaturi scăzute este de dată relativ recentă atât la nivel național cât și internațional, cunoscându-se proprietățile acestora.
- Au fost caracterizate biochimic și genetic trei tulpini de streptomicete psihrotolerante, selecționate, ca potențiali producători de amilaze și proteaze, active la temperaturi scăzute, în contextul în care se cunoaște dificultatea stabilirii identității filogenetice a streptomicetelor.

Având ca punct de plecare cercetările realizate pe plan mondial, teza a vizat inițierea și în România a studiilor privind obținerea de enzime exploatând potențialul microorganismelor extremofile, cu implicații în cercetarea fundamentală și aplicativă, în acord cu afirmația *Cold-adapted microorganisms have much more to give to the field of biotechnology* (Gerday et al., 2000).

Rezultatele obținute susțin noi direcții de cercetare și anume:

- Transpunerea biotehnologiei de producere a amilazelor și proteazelor, active la temperaturi scăzute, cu tulpina psihrotolerantă selecționată, *Streptomyces 4 Alga*, la nivel de stație pilot și industrial.
- Imobilizarea preparatelor enzimatic brut, prin tehnici moderne și eficiente de imobilizare, și studiul comportamentului catalitic în sisteme model și naturale.
- Utilizarea enzimelor adaptate la temperaturi scăzute în diferite procese cu implicații industriale (obținerea de alimente și aditivi alimentari, obținerea de detergenți etc.) și în procese de bioremediere.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Abou-Elala, G.M., Nermeen, A.E-S., Wefky, S.H. 2009. Statistical optimization of cold adapted α -amylase production by free and immobilized cells of *Nocardopsis aegyptia*. *Journal of Applied Science Research*, 5:286-292.

Anderson, A., Wellington, E.M.H. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:797-814.

Bahrim, G., Nicolau, A. 2002b. *Biotehnologia preparatelor enzimatic. Tehnici și analize de laborator*. Ed. Academica, Galați.

Baghel, V.S., Tripathia, R.D., Ramtekeb, P.W., Gopal, K., Dwivedia, S., Jain, R.K., Raia, U.N., Singha, S.N. 2005. Psychrotrophic proteolytic bacteria from cold environment of Gangotri glacier, Western Himalaya, India. *Enzyme and Microbial Technology*, 36:654-659.

Cavicchioli, R., Siddiqui, K.S., Andrews, D., Sowers, K.R. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:253-261.

Feller, G., Gerday, C. 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews. Microbiology*, 1:200-208.

Fujiwara, S. 2002. Extremophiles: Developments of their special function and potential resources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94:518-525.

Galante, Y.M., Formantici, C. 2003. Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries. *Current Organic Chemistry*, 7:1399-1422.

Hayakawa, M., Yoshida, Y., Iimura, Y. 2004. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceus* phenotypic cluster. *Journal of Applied Microbiology*, 96:973-981.

Holt, J.G. 1989. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1st Edition Williams & Wilkins, Baltimore.

Hough, D.W., Danson, M.J. 1999. *Extremozymes. Current Opinion in Chemical Biology*, 3:39–46.

Hoyoux, A., Blaise V., Collins T., D'Amico S., Gratia E., Huston A. L., Zeng Y., Feller G., Gerday, C. 2004. Extreme catalysts from low-temperature environments. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98:317-330.

Kar, S., Ray, R.C. 2008. Partial characterization and optimization of extracellular thermostable Ca²⁺ inhibited α -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67:58-64.

Lazim, H., Mankai, H., Slama, N., Barkallah, I., Limam, F. 2009. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36:531–537.

Madigan, M., Martinko, O.J. 2005. *Brock Biology of Microorganisms*, 11 Editions, Publisher Benjamin Cummings.

Margesin, R., Dieplinger, H., Hofmann, J., Sarg, B., Lindner, H. 2005. A cold-active extracellular metalloprotease from *Pedobacter cryoconitis* – production and properties. *Research in Microbiology*, 156:499-505.

Marx, J.C., T. Collins, S. D'Amico, G. Feller, C. Gerday. 2006. Cold-adapted enzymes from marine Antarctic Microorganisms. *Marine Biotechnology*, 9:293-304.

Metha, V.J, Trumar, J.T. Singh, S.P. 2006. Production of alkaline protease from an alkalophilic actinomycete. *Bioresources Technology*, 97:1650-1654.

Mitra, P., Chakrabartty, P.K. 2005. An extracellular protease with depilation activity from *Streptomyces nogalator*. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64:978-983.

Morita, R.Y. 1975. Psychrophilic bacteria. *Biotechnological Reviews*, 39:144-167.

Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R and Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, 77:149-162.

Park, J.W., Oh, Y.S., Lim, J.Y., Roh, D.H. 2006. Isolation and characterisation of cold-adapted strains producing β -galactosidase. *The Journal of Microbiology*, 44:394-402.

Shanmughapriya, S., Kiran, G.S., Selvin, J., Gandhimathi, R., Baskar, T.B., Aseer Manilal, A., Sujith, S. 2009. Optimization, production, and partial characterization of an alkalophilic amylase produced by sponge associated marine bacterium *Halobacterium salinarum* MMD047. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14: 67-75.

Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C.R, Pandey, A. 2006. α -Amylases from microbial sources – An overview on recent developments. *Food Technology and Biotechnology*, 44:173–184.

Taddei, A., Rodriguez, M.R., Marquez-Vilchez, E., Castelli, C. 2006. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies.I. *Microbiological Research*, 161:222-231.

Ueda, M., Asano, T., Nakazawa, M., Miyatake, K., Inouye, K. 2008. Purification and characterization of novel raw-starch-digesting and cold-adapted α -amylases from *Eisenia foetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology, part B*, 150:125-130.

You, J.L., Cao, L.X., Liu, G.F. 2005. Isolation and characterisation of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21:679-682.

DISEMINAREA REZULTATELOR CERCETĂRIILOR

Articole în reviste cotate și indexate ISI

Mihaela Cotârleț, Gabriela E. Bahrim. 2011. Optimization of cold-adapted amylases and protease production by psychrotrophic *Streptomyces* 4 Alga using response surface methodology. *Turkish Journal of Biochemistry*, 36 (2), 83–92

Mihaela Cotârleț, Teodor G. Negoită, Gabriela E. Bahrim, Peter Stougaard. 2011. Partial characterization of cold active amylases and proteases of *Streptomyces* sp. from Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*. In press.

Mihaela Cotârleț, Gabriela E. Bahrim, Teodor G. Negoită, Peter Stougaard. 2010. Characterisation of newly polar psychrotrophic streptomycetes isolates from polar soils with cold adapted bioremediation potential. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38:61-65.

Mihaela Cotârleț, Gabriela Bahrim, Teodor Negoită, Peter Stougaard. 2010. Comparative study for establishing the efficiency of some methods for chromosomal DNA extraction at cold adapted streptomycetes. *Romanian Biotechnological Letters*, 15:5482-5486.

Mihaela Cotârleț, Teodor Negoită, Gabriela Bahrim, Peter Stougaard. 2008. Screening of polar streptomycetes able to produce cold-active hydrolytic enzymes using common and chromogenic substrates. *Romanian Biotechnological Letters*, 13, supplement:69-80.

Articole indexate in baze de date internaționale

Mihaela Cotârleț, Teodor Negoită, Gabriela Bahrim, Peter Stougaard. 2009. Cold adapted amylase and protease from new *Streptomyces* 4 Alga Antarctic strain. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 5:23-30.

Mihaela Cotârleț, Teodor Negoită, Gabriela Bahrim, Peter Stougaard. 2008. Cold-adaptation and alkaline hydrolytic proprieties of the polar streptomycetes prediction on plate assay, based on insoluble chromogenic substrates with azurine cross-linked. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI – Food Technology, New Series, Year I (XXXI)*, 17–22.

Lucrări comunicate la conferințe din străinătate și din țară

Mihaela Cotârleț, Teodor Negoită, Gabriela Bahrim, Peter Stougaard. 2009. Isolation and characterization of novel cold-active hydrolyses from Antarctic streptomycetes. *Electronic Conference on Interactions between Antarctic Life and Environmental Factors, IPY-related Research, Brno, Czech Republic, Book of Abstracts and Contributed Papers*, 62-66.

Pe perioada stagiului doctoral autoarea a beneficiat de trei stagii de specializare desfășurate în cadrul Departamentului de Agricultură și Ecologie, Facultatea de Științele Vieții, Universitatea din Copenhaga, Danemarca. Stagiile au fost susținute financiar prin proiectul Contract nr. 1 Europolar/29.03.2010 finanțat de UEFISCSU, coordonator, Institutul Român de Cercetări Polare, director de proiect dr. ing. Teodor Gheorghe NEGOIȚĂ.

În perioada 2008-2010, autoarea a beneficiat și de o bursă tip BD acordată de CNCSIS, cu tema „Evaluarea potențialului bacteriilor din biotopuri polare privind obținerea de enzime cu implicații industriale”.