

II 39.658

UNIVERSITATEA DUNĂREA DE JOS  
FACULTATEA DE ȘTIINȚA ȘI INGINERIA ALIMENTELOR

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

**OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA GLICOZID-HIDROLAZELOR  
DIN FAMILIA XILANAZE BIOSINTETIZATE  
DE STREPTOMICETE SELECȚIONATE**



Doctorand  
Gigi COMAN

Coordonator științific  
Prof.dr.ing. Gabriela BAHRIM

GALAȚI  
2011

11/ 39. 658

ROMANIA  
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

C2104/11.03.2014

Către

\_\_\_\_\_

Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați vă face cunoscut că în data de \_\_\_\_\_, ora \_\_\_\_\_, în \_\_\_\_\_, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată: "Obținerea și caracterizarea glicozid-hidrolazelor din familia xilanaze biosintetizate de streptomicete selectionate", elaborată de domnul/doamna ing. COMAN GIGI, în vederea conferirii titlului științific de doctor în Domeniul de doctorat - Ingenierie industrială.

Comisia de doctorat are următoarea componență :

**Președinte:**

Prof.univ.dr.ing. Petru ALEXE  
Decan - Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor  
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

**Conducător de doctorat:**

Prof.univ.dr.ing. Gabriela-Elena BAHRIM  
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

**Referent 1:**

Prof.univ.dr. Valentin POPA  
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași

**Referent 2:**

Prof.univ.dr. Stefana JURCOANE  
Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară - București

**Referent 3:**

Conf.univ.dr.ing. Luminița GEORGESCU  
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

CUPRINS

Cuvânt înainte.....	1
Lista de abrevieri .....	7

DATE DIN LITERATURA DE SPECIALITATE

<b>1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII PRIVIND OBTINEREA ȘI UTILIZAREA GLICOZIDAZELOR DIN FAMILIA XILANAZE CU IMPACT ECONOMIC ȘI PENTRU PROTECȚIA MEDIULUI ÎNCONJURĂTOR.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1. Preparate enzimatiche din familia xilanazelor și implicațiile practice .....</b>	<b>12</b>
1.1.1. Extracția și clarificarea sucurilor de legume și fructe.....	13
1.1.2. Extracția uleiului de măsline.....	14
1.1.3. Îmbunătățirea calității produselor de panificație .....	14
1.1.4. Folosirea celulozelor și hemicelulozelor în biotehnologia vinului și berii.....	15
1.1.5. Obținerea furajelor.....	16
1.1.6. Celulozele și xilanazele în biotehnologia textilelor și în industria detergenților .....	16
1.1.7. Celulozele și hemicelulozele în industria hârtiei .....	17
1.1.8. Bioconversia biomasei vegetale .....	17
<b>1.2. Streptomicetele - noi agenți pentru obținerea de glicozid-hidrolaze de tip xilanazic cu valoare economică.....</b>	<b>19</b>
1.2.1. Introducere în biologia streptomicetelor.....	19
1.2.2. Taxonomia genului <i>Streptomyces</i> .....	21
1.2.3. Caracterele morfologice ale streptomicetelor comparativ cu alte bacterii.....	24
1.2.4. Caractere fiziologice generale ale actinomicetelor din genul <i>Streptomyces</i> .....	28
1.2.5. Elemente de genetică a streptomicetelor .....	31
1.2.6. Tehnici de izolare și conservare a streptomicetelor.....	32
1.2.7. Reprezentanți ai genului <i>Streptomyces</i> producători de xilanaze.....	35
<b>1.3. Condiții biotehnologice de producere a xilanazelor cu streptomicete selecționate.....</b>	<b>37</b>
1.3.1. Compoziția mediilor fermentative.....	37
1.3.2. Condiții biotehnologice pentru bioproducerea de xilanaze cu ajutorul streptomicetelor .....	43
1.3.3. Factori fizico-chimici care influențează procesul biotehnologic de producere a xilanazelor cu streptomicete .....	48
1.3.4. Modalități de creștere a randamentului de biosinteză a enzimelor xilanolitice.....	50
1.3.5. Utilizarea mutagenzei și a tehnicilor de inginerie genetică în creșterea productivității enzimatiche.....	51
<b>1.4. Recuperarea, purificarea și caracterizarea enzimelor din complexe multienzimatiche .....</b>	<b>53</b>
1.4.1. Hemicelulozele - substratul specific glicozid-hidrolazelor de tip xilanazic .....	53
1.4.2. Caracterizarea și proprietățile catalitice ale enzimelor xilanazice.....	59
1.4.3. Aspecte privind structura glicozid-hidrolazelor de tip xilanazic.....	61
1.4.4. Proprietățile catalitice ale enzimelor xilanazice.....	64
1.4.5. Recuperarea, purificarea și stabilizarea glicozid-hidrolazelor de tip xilanazic.....	65

Referințe bibliografice .....	68
<b>REZULTATE EXPERIMENTALE ȘI CONTRIBUȚII</b>	
<b>2. IZOLAREA ȘI SELECȚIA UNOR TULPINI DE STREPTOMICETE PRODUCĂTOARE DE HEMICELULAZE DE TIP XILANAZIC .....</b>	<b>78</b>
2.1. Introducere .....	78
2.2. Materiale și metode de investigare .....	79
2.2.1. Probe de sol .....	79
2.2.2. Culturi de <i>Streptomyces</i> spp. ....	79
2.2.3. Reactivi .....	79
2.2.4. Medii de cultură .....	79
2.2.5. Echipamente .....	80
2.2.6. Metode de analiză .....	81
2.3. Rezultate și discuții .....	90
2.3.1. Izolarea din sol a tulpinilor din genul <i>Streptomyces</i> .....	90
2.3.2. Selecția calitativă a tulpinilor cu activitate hemicelulozolică .....	96
2.3.3. Creșterea eficienței selecției prin utilizarea substraturilor cromogenice insolubile .....	99
2.3.4. Caracterizarea morfofiziologică a tulpinilor selecționate cu activitate xilanazică .....	103
2.3.5. Evaluarea potențialului tulpinilor selecționate de a sintetiza enzime glicozid-hidrolazice de tip xilanazic în condiții de cultivare submersă .....	107
2.3.6. Dinamica modificării pH-ului mediului fermentative în timpul cultivării streptomicetelor și bioproducerii de xilanaze .....	111
2.3.7. Evaluarea comparativă a dinamicii de creștere și de biosinteză a xilanazelor la tulpinile selecționate .....	113
2.4. Concluzii .....	115
Referințe bibliografice .....	116
<b>3. OPTIMIZAREA COMPOZIȚIEI MEDIULUI FERMENTATIV PENTRU CONTROLUL BIOSINTEZEI DE XILANAZE LIBERE DE CELULAZE .....</b>	<b>118</b>
3.1. Introducere .....	118
3.2. Materiale și metode de investigare .....	119
3.2.1. Microorganisme .....	119
3.2.2. Reactivi utilizați .....	119
3.2.3. Medii de cultură .....	119
3.2.4. Echipamente .....	120
3.2.5. Metode de analiză .....	121
3.3. Rezultate și discuții .....	128
3.3.1. Evaluarea efectului calitativ și cantitativ al surselor de carbon asupra creșterii streptomicetelor selecționate și biosintezei de xilanază .....	128
3.3.2. Evaluarea efectului calitativ și cantitativ al sursei de azot asupra creșterii streptomicetelor și biosintezei de xilanază .....	131
3.3.3. Determinarea raportului optim între sursa de carbon și sursa de azot în mediul fermentative .....	133

3.3.4. Optimizarea compoziției mediului fermentativ prin modelare matematică (metoda suprafeței de răspuns).....	134
3.3.5. Comportamentul biotehnologic al tulpinii selecționate prin cultivare pe mediul optimizat.....	148
3.3.6. Testarea comportamentului biotehnologic al tulpinii <i>Streptomyces</i> spp. P12-137 în condiții pilot.....	149
3.4. Concluzii.....	154
Referințe bibliografice.....	155
<b>4. STABILIREA CONDIȚIILOR OPTIME DE RECUPERARE, PURIFICARE ȘI CARACTERIZARE A COMPORTAMENTULUI CATALITIC A XILANAZELOR ÎN SISTEME MODEL ȘI PE SUBSTRATURI NATURALE.....</b>	<b>157</b>
4.1. Introducere.....	157
4.2. Materiale și metode de investigații.....	158
4.2.1. Mediul fermentativ optimizat.....	158
4.2.2. Microorganisme.....	158
4.2.3. Reactivi.....	158
4.2.4. Echipamente.....	159
4.2.5. Metode de analiză.....	160
4.3. Rezultate și discuții.....	171
4.3.1. Purificarea parțială a xilanazei sintetizată de tulpina selecționată <i>Streptomyces</i> spp. P12-137 prin procedeul „salting out”.....	171
4.3.2. Evidențierea proprietăților electroforetice ale xilanazei sintetizate de tulpina <i>Streptomyces</i> spp. P12-137.....	173
4.3.3. Proprietățile catalitice ale xilanazei sintetizate de tulpina <i>Streptomyces</i> spp. P12-137 în extractul brut.....	175
4.3.4. Evaluarea comportamentului catalitic al xilanazei parțial purificate.....	177
4.3.5. Comportamentul hidrolitic al preparatului xilanazic brut asupra substraturilor xilanazice.....	189
4.4. Concluzii.....	194
Referințe bibliografice.....	195
<b>5. CONCLUZII GENERALE, ASPECTE ORIGINALE ȘI PERSPECTIVE DE CONTINUARE A CERCETĂRILOR.....</b>	<b>197</b>
<b>DISEMINAREA REZULTATELOR CERCETĂRILOR</b>	

## OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat cu tema: *Obținerea și caracterizarea glicozid-hidrolazelor din familia xilanaze biosintetizate de streptomicete selecționate* a vizat obținerea de enzime din clasa glicozid-hidrolaze, în special cele aparținând familiei xilanaze cu ajutorul unor tulpini selecționate de *Streptomyces* spp. cultivate pe substraturi lignocelulozice și hemicelulozice.

Ținând cont de problemele tot mai stringente la nivel mondial legate de protecția mediului, de epuizare a resurselor de combustibili convenționali, rezultatele cercetărilor oferă date originale privind rentabilizarea bioprocесelor de bioconversie a biomasei lignocelulozice, precum și unor aplicații în știința și ingineria alimentelor.

Obiectivele științifice stabilite în acord cu programul de cercetare al stagiului de doctorat au vizat:

- Izolarea din mediile naturale și selecția unor tulpini de streptomicete capabile să sintetizeze enzime cu activitate glicozid-hidrolazică.
- Studiul și optimizarea condițiilor biotehnologice în vederea obținerii unui randament ridicat de biosinteză a glicozid-hidrolazelor din familia xilanaze cu ajutorul streptomicetelor.
- Evaluarea comportamentului catalitic al enzimelor din complexe multienzimatice în stare brută în vederea standardizării produsului finit.
- Purificarea și analiza proprietăților catalitice ale xilanazei parțial purificate.
- Cercetări privind comportamentul catalitic al xilanazei pe xilan pur și tărâțe.

Oportunitatea cercetărilor derivă din importanța temei cu implicații în cercetarea fundamentală și aplicativă după cum urmează:

- streptomicetele sunt bacterii aflate în concentrație crescută în sol fiind caracterizate printr-un echipament enzimatic extrem de divers;
- streptomicetele cresc ușor pe medii simple pe bază de ingrediente ieftine și în condiții de eficiență economică;
- studiile bioproduserii enzimelor de tipul glicozid-hidrolaze cu streptomicete sunt de dată recentă, majoritatea enzimelor comerciale de acest tip fiind obținute cu ajutorul fungilor filamentoși sau eubacteriilor;
- obținerea și utilizarea xilanazelor libere de celulaze prin controlul și dirijarea procesului fermentativ reprezintă de asemenea abordări științifice de noutate;
- obținerea enzimelor glicozid-hidrolaze are importanță economică și aplicații în diverse domenii, precum bioconversia biomasei, industria de celuloză și hârtie, industria alimentară, etc.

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 este structurată în două părți, studiu documentar și rezultate experimentale și contribuții.

## STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat conține 202 pagini, dintre care partea de introducere reprezintă 11 pagini, partea documentară reprezintă 67 pagini (35,07 %), iar partea experimentală este prezentată în 124 pagini (64,93 %). În lucrare sunt prezentate 104 figuri și 46 tabele. Pentru

structurarea și elaborarea tezei s-au utilizat 180 referințe bibliografice și 9 adrese web consultate.

## A. STUDIU DOCUMENTAR

Studiul documentar, intitulat *Stadiul actual al cunoașterii privind obținerea și utilizarea glicozidazelor din familia xilanaze cu impact economic și pentru protecția mediului înconjurător* (un capitol ce include patru subcapitole), prezintă date din literatură cu referire la descrierea stadiului cercetărilor la nivel mondial privind clasificarea, structura și proprietățile xilanazelor, condițiile biotehnologice de obținere și microorganismele cu potențial crescut de a sintetiza aceste enzime. De asemenea, sunt prezentate aplicațiile practice ale xilanazelor.

**Subcapitolul 1.1.** intitulat *Preparate enzimatic din familia xilanazelor și implicațiile practice* prezintă importanța glicozid-hidrolazelor de tip xilanazic asupra prelucrării eficiente a biomasei vegetale și a deșeurilor agroindustriale precum și posibilele aplicații în industria alimentară, industria de celuloză și hârtie, industria textilă, industria de obținere a unor produse chimice etc.

**În subcapitolul 1.2.** intitulat *Streptomicetele - noi agenți pentru obținerea de glicozid-hidrolaze de tip xilanazic cu valoare economică* sunt prezentate streptomicetele, agenți importanți producători de enzime, larg răspândite în natură în special în sol și cu capacități crescute de adaptare la condițiile industriale.

**Subcapitolul 1.3.** cu titlul *Condiții biotehnologice de producere a xilanazelor cu streptomicete selecționate* prezintă modul de optimizare a compoziției mediului de cultură în sensul obținerii unui randament crescut în xilanază utilizând metode statistice moderne precum și studiul condițiilor fermentative în sistem submers pe bioreactorul de laborator.

**În subcapitolul 1.4.** *Recuperarea, purificarea și caracterizarea enzimelor din complexele multienzimatice* prezintă modul de extracție și purificare a glicozid-hidrolazelor de tip xilanazic din lichidul cultural precum și modul de caracterizare ale acestora.

Anual se produc 830 Gt de biomasă vegetală regenerabilă bogată în celuloză și hemiceluloză (Ruanglek et al. 2006). Peretele celular al plantelor este un material compozit, în care celuloza, hemicelulozele (alcătuite în principal din xilan) și lignina sunt strâns asociate (Puls, 1997; Bissoon et al., 2002). Cei trei constituenți majori ai lemnului de pădure sunt celuloza (30...50%), hemiceluloza (20...30%), un grup de poliglucide în care xilanul este component major și lignina (20...30%).

Din punct de vedere chimic, hemicelulozele sunt poliglucide ale peretelui celular vegetal, obișnuit ramificate, cu o structură omoloagă celulozei în sensul că, au un lanț principal alcătuit din resturi de  $\beta$ -D-piranozil legate-1,4, cum ar fi glucoza, manoză și xiloza, în care atomul de oxigen se află într-o poziție ecuatorială. Xiloglucanii, xilanii și mananii sunt incluși în această definiție chimică a hemicelulozelor, excepție făcând arabinogalactanii. Similitudinea structurală dintre hemiceluloze și celuloze dau probabil o omologie conformațională care dau o asociere necovalentă puternică dintre acestea.

Cel mai abundent polimer hemicelulozic este xilanul alcătuit din unități de xiloză legate  $\beta$ -1,4. Xilanul constituie 20...40% din biomasa vegetală totală (Ninawe et al. 2008). Xilanul reprezintă o

imensă sursă de biopolimeri pentru aplicații practice, reprezentând 25...30% din biomasa uscată a dicotiledonatelor și a plantelor lemnoase și 50% în plantele cerealiere (Moure et al. 2006).

Natura este bogată în bacterii și fungi care produc enzime ce degradează peretele celular solubilizând componentele complexe la molecule simple pentru asigurarea ciclului de carbon. Numeroase microorganisme izolate din sol, deșeuri, compost sunt capabile de a produce un spectru larg de enzime care degradează peretele celular vegetal (Badhan et al. 2007). Un loc important din această microbiotă o ocupă streptomicetele care reprezintă între 10 ...33 % din micropopulația solului (Zarnea, 1994).

Numele de *Streptomyces* vine de la gr. *streptos* – aplecat, îndoit, flexibil și gr. *myces* – fung. Sunt bacterii Gram pozitive, filamentose care au habitatul în marea lor majoritate în microbiota solului și prezintă capacitatea de a forma spori. Aparțin familiei *Streptomycetaceae*, ordinul *Actinomycetales*, clasa *Schizomycetes* (Robinson, 2000). Hifele vegetative cu dimensiuni de (0,5...2,0 μm), produc miceliul ramificat, extins, din care ulterior se va dezvolta miceliul aerian care, la maturitate, va forma lanțuri de trei sau mai mulți spori.

În condiții naturale, streptomicetele încep să se dezvolte pe resturile vegetale după ce în prealabil bacteriile și ciupercile au încetat să se mai multiplice când practic substratul este pregătit de către acestea printr-o descompunere primară a compușilor constituienți (Madigan, 2000). Streptomicetele sunt considerate în mod obișnuit a fi mult mai active în stadiile avansate de descompunere a plantelor și a altor materiale, jucând un rol important în turnover-ul complex al polimerilor recalcitranti. S-a demonstrat că unele streptomicete atacă și celuloza și lignina, cei doi componenți ai lignocelulozei pe baza echipamentului enzimatic bogat pe care aceste microorganisme reușesc să-l producă.

Degradarea completă a complexului heteropoliglucidic necesită enzime care să acționeze atât asupra lanțului (catenei) principale cât și a lanțurilor laterale (catenele ramificate): endoxilanaza (endo β-1,4 xilanaza, EC 3.2.1.8), β – xilozidaza (xilan β-1,4 xilozidaza, EC 3.2.1.37), α-glicuronidaza (EC 3.2.1.139), α-arabinofuranozidaza (EC 3.2.1.55), acetilsteraza (EC 3.1.1.72) (Choi et al. 2000). Endo-β-1,4 xilanaza catalizează hidroliza catenei principale a xilanului producând xilooligogluclide care la rândul lor pot fi convertite la xiloză prin intermediul β-xilozidazei (Zhang et al. 2007).

Ținând cont de rolul pe care-l ocupă în natură aceste microorganisme s-a considerat că ar reprezenta surse valoroase pentru obținerea de glicozid-hidrolaze de tip xilanazic. Aplicarea unor tehnici de izolare și selecție adecvate asupra streptomicetelor din mediul natural precum și optimizarea condițiilor și parametrilor fermentativi ar permite obținerea la nivel de instalații pilot și industrial a acestor enzime care își găsesc din ce în ce mai multe aplicații în diverse domenii. Valoarea estimată a pieței mondiale de enzime este în jur de 130 milioane dolari americani și se așteaptă să crească până la 200 milioane dolari americani. Principalele industrii care utilizează 75% din producția de enzime industriale sunt: a detergentilor 37%, textile 12%, amidon 11%, panificație 8% și a nutrețurilor pentru animale 6%. Xilanazele și celulozele împreună cu pectinazele reprezintă 20% din piața mondială a enzimelor (Polezeli et al. 2005).

Biotehnologia celulozelor și hemicelulozelor și-a pus bazele la începutul anilor 1980, prima dată cu utilizări în tratarea furajelor, urmată de aplicații în industria alimentară. Ulterior aceste enzime au fost folosite în industria textilă, precum și la obținerea hârtiei sau celulozei. Utilizarea enzimelor celulozolitice și hemicelulozolitice a crescut spectaculos în ultimele două decenii în special în industriile textilă, a berii și a vinului, în procesarea alimentelor, precum și în industria celulozei și hârtiei. În prezent acestora le sunt atribuite 20% din piața mondială a enzimelor, ca sursă de obținere fiind fungii din genurile *Trichoderma* și *Aspergillus*. În mod curent, numeroși producători



de preparate enzimatiche comercializează enzime „proiectate” special pentru un uz adecvat în biotehnologie.

Pornind de la interesul crescând asupra acestor enzime și mai ales asupra xilanazelor libere de celulaze, evidențiat prin multitudinea de articole apărute în ultimii ani, studiul își propune obținerea în condiții de laborator a acestor enzime utilizând tulpini selecționate de streptomicete din mediul natural.

## B. STUDIU EXPERIMENTAL

Rezultatele experimentale și contribuțiile la dezvoltarea cunoașterii sunt prezentate în trei capitole.

**Capitolul 2 - Izolarea și selecția unor tulpini de streptomicete producătoare de hemicelulaze de tip xilanazic** prezintă rezultatele cercetărilor proprii referitoare la izolarea din surse naturale a bacteriilor din genul *Streptomyces*, selecția pe criterii calitative și cantitative a unor tulpini active, cu capacitatea de a biosintetiza xilanaze în condiții biotehnologice controlate.

**Capitolul 3 - Optimizarea compoziției mediului fermentativ pentru inducerea biosintezei de xilanaze libere de celulaze** este structurat pe patru subcapitole în care se prezintă cercetări originale realizate în vederea formulării și optimizării mediului fermentativ astfel încât utilizând surse ieftine de carbon să se obțină un randament sporit de bioproducere a xilanazelor.

**Capitolul 4 - Stabilirea condițiilor optime de recuperare, purificare și caracterizare a comportamentului catalitic a xilanazelor în sisteme model și pe substraturi naturale** este structurat în patru subcapitole cu referire la metodele aplicate pentru recuperarea și purificarea enzimelor din lichidul cultural. De asemenea, se prezintă date referitoare la proprietățile catalitice și comportamentul xilanazelor în sisteme model și alimentare.

### Capitolul 2 - Izolarea și selecția unor tulpini de streptomicete producătoare de hemicelulaze de tip xilanazic

**Probe de sol:** Au fost analizate 16 probe diferite de sol, recoltate din 4 județe ale țării: Galați, Constanța, Tulcea, Alba. Caracteristicile solurilor au fost diferite: soluri nisipoase, de grădină, din ghivece cu flori dar și sol comercial mixt produs de S.C. Luiza SRL.

**Culturi de *Streptomyces* spp.:** culturi pure de *Streptomyces* spp. izolate din soluri autohtone în perioada noiembrie 2007 – martie 2008.

**Reactivi:**

- ingrediente pentru medii de cultură: substraturi cromogene insolubile comerciale (AZCL-HE Cellulose, AZCL-Xylan (din lemn de esență tare); AZCL-Xylan (din tărâțe de ovăz), Megazyme International Ireland Ltd), CaCO<sub>3</sub>, NaCl, amidon de cartof, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, KNO<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, agar;
- reactivi pentru evidențierea producerii enzimelor xilanaze și celulaze: tartrat de sodiu și potasiu, hidroxid de sodiu, acid 3,5 dinitrosalicilic (DNS), carbonat de

sodiu, sulfat de cupru hidratat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), citrat de sodiu, acid acetic, acetat de sodiu, xilan de mesteacăn, carboximetilceluloza (CMC);

**Echipe** din infrastructura Platformei de formare și cercetare interdisciplinară „BIOALIMENT”:

- Microscop cu epifluorescență și contrast de fază, Olympus;
- Stereomicroscop cu cameră digitală integrată, Leica;
- Liofilizator, Martin Christ;
- Spectrofotometrul UV-VIS Jenway 6505, Jenway;
- Shaker orbital Optic Ivymen Sistem, Lab Companion;
- Shaker Medline SI-300R, Jeio Tech;
- Baia de apă Julabo F 33, Julabo;
- Autoclav Raypa AE 75 Dry, Respinar, SL.;
- Balanța analitică Mettler Toledo XS Excellence, Mettler Toledo;
- pH-metrul Mettler Toledo;
- Centrifugă Hettich Zentrifugen Universal 320 R, Hettich;
- Centrifugă Hettich Mikro 22R, Hettich;
- Nișă cu flux laminar, Cruma;
- Etuvă cu convecție naturală 115L, model ED 115, Binder;
- Vortex V1 plus, Boeco.

#### Metode de analiză

- Tehnica de izolare selectivă a tulpinilor din genul *Streptomyces*
- Tehnica clasică de selecție calitativă a streptomicetelor producătoare de enzime glicozid-hidrolazice.
- Creșterea eficienței selecției prin cultivarea pe substraturi cromogenice insolubile
- Studiul caracterelor morfologie ale tulpinilor selecționate de streptomicete.
- Evaluarea comportamentului biochimic al tulpinilor de streptomicete selecționate.
- Tehnica de selecție cantitativă a streptomicetelor producătoare de glicozid-hidrolaze de tip xilanazic.

Determinarea xilanazelor și celulazelor s-a efectuat în conformitate cu tehnicile propuse de [www.biopract.de](http://www.biopract.de), Khurana, (2007), Assamoi și al., (2008), Senthilkumar și al., (2005) ș.a. A avut ca principiu determinarea glucidelor reducătoare exprimate ca echivalent xiloză în cazul xilanazelor sau echivalent glucoză în cazul celulazelor prin metoda DNS (acidul 3,5-dinitrosalicilic). Aceste glucide reducătoare sunt eliberate în cursul reacției enzimatic care se desfășoară la condițiile de reacție stabilite.

*O unitate de activitate enzimatică (xilanazică sau celulazică)* reprezintă numărul de  $\mu\text{moli}$  de glucid reducător rezultat prin acțiunea hidrolitică exercitată de 1 ml preparat enzimatic, în timp de 1 minut, în condițiile de reacție testate și anume: substrat – 1,5 % xilan din mesteacăn sau 1,5 % CMC; pH = 5,0 în soluție tampon 0,2M acetat, temperatura de 50°C; timp de reacție 20 minute, un raport enzimă:substrat de 1:10.

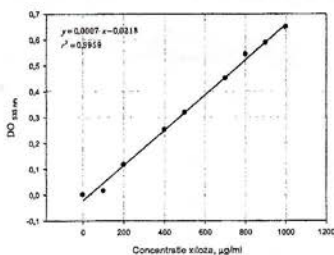


Figura 2.1 Curba etalon pentru dozarea xilozei prin metoda cu acid 3,5-dinitrosalicilic

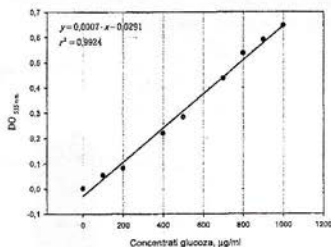


Figura 2.2 Curba etalon pentru dozarea glucozei prin metoda cu acid 3,5-dinitrosalicilic

Pentru determinarea proteinelor s-a utilizat metoda Lowry proteinele formând combinații complexe colorate în albastru violet, cu ionul  $\text{Cu}^{2+}$  în mediul alcalin (reacția biuretului). Complexul proteină- $\text{Cu}^{2+}$  reduce fosfomolibdații și fosfowolframații din reactivul Folin-Ciocalteu. La procesul de reducere mai contribuie și resturile de tirozină și triptofan prezente în proteine. Concentrația proteinelor din probă s-a determinat fotocolorimetric.

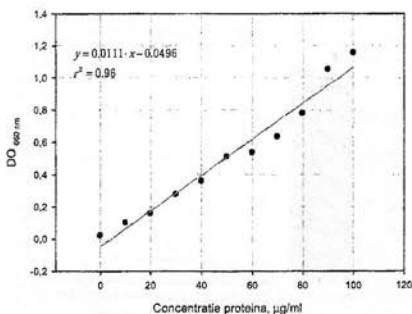


Figura 2.3 Curba etalon pentru determinarea proteinelor prin metoda Lowry

## Rezultate și discuții

### Izolarea din sol a tulpinilor din genul *Streptomyces*

Pentru izolarea tulpinilor de streptomicete s-au analizat 16 probe de sol, prelevate în perioada 10.11.2007- 01.09.2008 provenite din 4 județe ale țării: Galați, Constanța, Tulcea, Alba. Circa 88% dintre probele izolate sunt din solurile județului Galați (figura 2.4). După cum se observă în tabelul

2.4 s-au analizat mai multe tipuri sol: nisipos, sol de grădină (inclusiv sol provenit dintr-o seră de legume), sol argilos (figura 2.6).

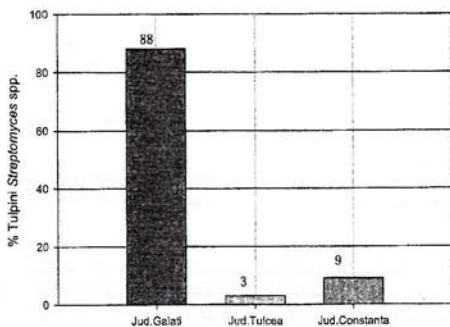


Figura 2.4 Repartiția pe zone de prelevare a probelor de sol din care sau izolat streptomicetele

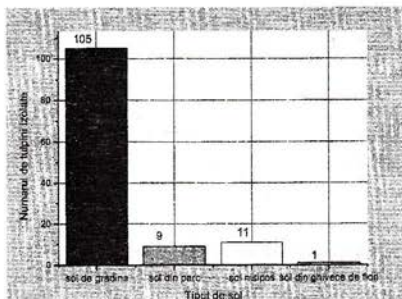


Figura 2.6 Distribuția tulpinilor de streptomicete izolate în funcție de sursa de origine a solului

Tabelul 2.4 Tulpini de streptomicete izolate din sol

TIPUL DE SOL	DATA, LOCUL PRELEVĂRII PROBEI	COD PROBA	COD TULPINI-STREPTOMYCES SPP. IZOLATE
Sol grădină	10.11.2007, Ivesti, Galați	P1	P1-1; P1-2; P1-3; P1-4; P1-5; P1-6; P1-7; P1-8; P1-9; P1-10; P1-11; P1-12; P1-13; P1-14; P1-15; P1-16; P1-17; P1-18; P1-19; P1-20; P1-21; P1-22; P1-23; P1-24; P1-25; P1-26; P1-27; P1-28; P1-29; P1-30; P1-31; P1-32; P1-33; P1-34; P1-35; P1-36; P1-37; P1-38; P1-39; P1-40; P1-41; P1-42; P1-43; P1-44; P1-45; P1-46; P1-47; P1-48; P1-49; P1-50; P1-51; P1-52; P1-53; P1-54; P1-55; P1-56; P1-57; P1-58; P1-59; P1-60; P1-61; P1-62; P1-63; P1-64; P1-65; P1-66; P1-67; P1-68; P1-69; P1-70; P1-71; P1-72; P1-73; P1-74; P1-75; P1-76; P1-77; P1-78; P1-79; P1-80; P1-81; P1-82; P1-83; P1-84; P1-85; P1-86; P1-87; P1-88; P1-89; P1-90; P1-91; P1-92; P1-93; P1-94; P1-95; P1-96; P1-97; P1-98; P1-99; P1-100; P1-101; P1-102; P1-103; P1-104; P1-105; P1-107; P1-108; P1-109; P1-110;
Sol grădină	27.11.2007, mun. Galați	P2	P2-10; P2-11; P2-12; P2-13;
Sol nisipos	28.11.2007, plaja Mangalia, Constanța	P3	P3-55; P3-65; P3-68;
Sol nisipos	13.12.2007, plaja Mamaia, Constanta	P4	P4-51; P4-52; P4-54; P4-58; P4-69; P4-79; P4-97; P4-99;
Sol ghiveci cu flori	2.02.2008, Ivesti, Galați	P5	P5-87;
Sol sera, culturi de legume	4.02.2008, Liești, Galați	P6	P6-18; P6-19; P6-20; P6-21; P6-22; P6-23; P6-24; P6-25; P6-26; P6-27; P6-28; P6-29; P6-30; P6-31; P6-32; P6-33; P6-60; P6-67; P6-73;
Pământ pentru flori proveniență comercială - producător SC Luiza SRL	13.02.2008, mun. Galați	P7	P7-34; P7-35; P7-36; P7-37; P7-38; P7-39; P7-40; P7-41; P7-42; P7-43; P7-44; P7-45; P7-46; P7-47; P7-48; P7-49; P7-50; P7-56; P7-57; P7-59; P7-61; P7-62; P7-63; P7-64; P7-66; P7-71; P7-72; P7-74; P7-75; P7-76; P7-77; P7-78; P7-80; P7-81; P7-82; P7-83; P7-84; P7-85; P7-86; P7-88; P7-89; P7-90; P7-91; P7-92; P7-93; P7-102; P7-106;
Sol teren viran	27.02.2008, mun. Galați	P8	P8-100; P8-132; P8-133;
Sol nisipos	04.03.2008, Pardoși, Buzau	P9	-
Rumeguș aflat în stare de degradare dintr-un depozit de cherestea	18.03.2008, mun. Tulcea	P10	P10-94; P10-95; P10-96; P10-98;
Sol grădină de zarzavat	20.04.2008, Grivița, Galați	P11	P11-118; P11-134;
Sol viță de vie	20.04.2008, Grivița, Galați	P12	P12-111; P12-112; P12-113; P12-114; P12-126; P12-127; P12-128; P12-137;
Sol grădină	20.04.2008, Grivița, Galați	P13	P13-116; P13-117; P13-129; P13-130; P13-131; P13-136;
Sol grădină	20.04.2008, Grivița, Galați	P14	P14-119; P14-120; P14-121; P14-122; P14-123; P14-124; P14-125;
Sol grădină	20.04.2008, Grivița, Galați	P15	P15-115; P15-135
Sol argilos	01.09.2008 Peștera Scărișoara, Alba	P16	-

Din cele 137 de tulpini izolate din probele de sol analizate, s-au identificat 126 de tulpini aparținând Grupei 25 *Streptomyces* conform *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1994, diferențierea făcându-se pe baza caracterelor culturale ale culturilor și a aspectului microscopic. Aproximativ 94% din totalul tulpinilor s-au clasificat ca aparținând genului *Streptomyces*, 3% unor mucegaiuri din genul *Trichoderma* și 1% unor actinomicete din genul *Streptoverticillium* (figura 2.9).

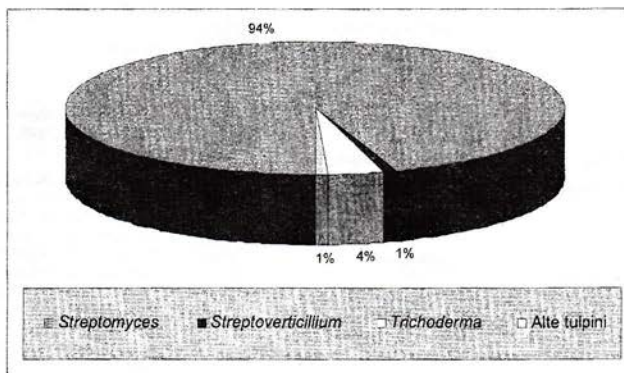


Figura 2.9 Distribuția tulpinilor de streptomicete din totalul microorganismelor izolate din sol

Pentru încadrarea taxonomică în genul *Streptomyces* s-a luat în considerare o serie de caractere culturale specifice prin cultivare pe mediul Gauze cu agar, și anume:

- producerea de geosmine care induc odorizarea similară cu ce a solului proaspăt arat;
- aspectul pulverulent sau catifelat a miceliului aerian al coloniilor ;
- pigmentația variată a celor două tipuri de micelii: de substrat și aerian.

#### Selecția calitativă a tulpinilor cu activitate hemicelulozitică

După izolarea și caracterizarea morfologică a tulpinilor de streptomicete, s-a trecut la aplicarea metodelor de selecție calitativă, urmărind alegera tulpinilor care biosintetizează enzime cu capacitate de a hidroliza substraturile xilan și celuloză.

Din cele 126 de tulpini de streptomicete izolate în cultură pură, 119 tulpini au prezentat activitate hemicelulozică, respectiv celulozică, xilanazică sau ambele. Cea mai mare parte dintre tulpini, 63% biosintetizează concomitent enzime celulozice și xilanazice. Cele cu activitatea xilanazică care au fost vizate în teză au fost 12%. Doar 2% nu au prezentat nici o activitate. Numărul mare de tulpini cu activitate hemicelulozică explică importanța acestui gen de microorganisme în descompunerea biomasei lignocelulozice (figura 2.13).

Tulpinile cu activitate xilanazică pe baza indicelui de hidroliza au fost clasificate în trei grupe, după cum urmează :

- înalt active,  $R_H = 6,5 \dots 9,5$

- moderat active,  $R_H = 3,5 \dots 6,4$
- slab active,  $R_H = 1 \dots 3,4$

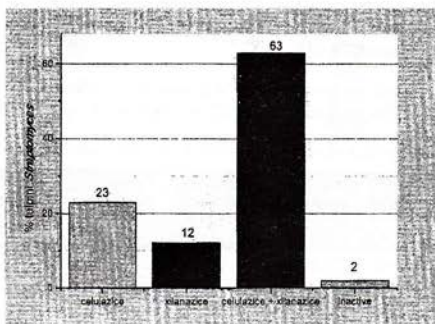


Figura 2.13 Evidențierea capacității de biosinteză a enzimelor hemicelulozice la tulpinile de *Streptomyces* spp. izolate

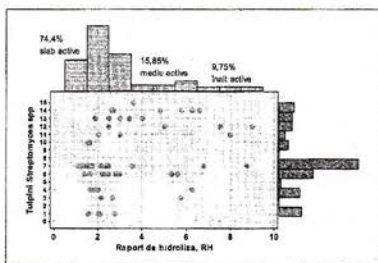


Figura 2.14 Clasificarea tulpinilor de *Streptomyces* spp. izolate în funcție de potențialul xilanazolitic

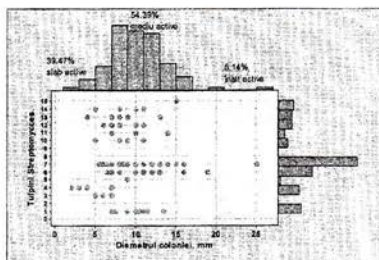


Figura 2.15 Clasificarea tulpinilor de de *Streptomyces* spp. izolate în funcție de potențialul celulozolitic

În ce privesc enzimele celulozolitice produse de streptomicetele izolate, s-a realizat o clasificare a tulpinilor după diametrul coloniilor, după cultivare la temperatura de 28°C, timp de 5 zile (figura 2.15), după cum urmează :

- înalt active,  $\Phi_{\text{colonie}} = 18 \dots 28$  mm ;
- active, moderat active,  $\Phi_{\text{colonie}} = 7 \dots 17$  mm ;
- slab active,  $\Phi_{\text{colonie}} = 1 \dots 6$  mm.

În urma primei etape de selecție calitativă s-au evidențiat 10 tulpini de streptomicete cu înalt potențial de biosinteză atât al enzimelor celulozice cât și a celor xilanaze: *Streptomyces* spp. P7-50, *Streptomyces* spp. P4 -51, *Streptomyces* spp. P3-65, *Streptomyces* spp. P7-72, *Streptomyces* spp. P12-111, *Streptomyces* spp. P12-137, *Streptomyces* spp. P14-124, *Streptomyces* spp. P14 -123, *Streptomyces* spp. P14 -120, *Streptomyces* spp. P11-118.

S-au ales din aceste 10 tulpini pe primele trei cu potențialul enzimatic cel mai ridicat, respectiv : *Streptomyces* spp. P12-137, *Streptomyces* spp. P11-118, *Streptomyces* spp. P7-72 (tabelul 2.5).

Tabelul 2.5 Rezultatele selecției calitative a tulpinilor de *Streptomyces* producătoare de xilanaze și celuleze

Nr. crt.	Tulpina	Cod tulpina	Potențialul celulozitic	Diametrul coloniei, Dc, [mm]	Potențialul xilanolic	Diametrul coloniei, Dc, [mm]	Diametrul zonei de hidroliza, Dh, [mm]	Raport de hidroliza xilanului, Ri
1	<i>Streptomyces</i> spp.	P12-137	+++	7	++++	3	27	9
2	<i>Streptomyces</i> spp.	P7- 72	+++	9	++++	3,5	30	8,75
3	<i>Streptomyces</i> spp.	P11-118	+++	7	++++	1,5	12	8
4	<i>Streptomyces</i> spp.	P12-111	+++/-	11	++++	2	15	7,5
5	<i>Streptomyces</i> spp.	P7- 50	+++/--	11	++++	5	34	6,80
6	<i>Streptomyces</i> spp.	P14-124	+++	10	++++	3,5	23	6,6
7	<i>Streptomyces</i> spp.	P4- 51	++/--	7	++++	4	25	6,25
8	<i>Streptomyces</i> spp.	P14-123	+++	10	++++	4	25	6,25
9	<i>Streptomyces</i> spp.	P14-120	+++	8	++++	6	35	5,8
10	<i>Streptomyces</i> spp.	P3- 65	+++	6	++++	4	23	5,75

#### Cresterea eficienței selecției prin utilizarea substraturilor cromogene insolubile

Tehnicile clasice de selecție calitativă nu oferă o fidelitate a rezultatelor și o apreciere pe criterii semicantitative a potențialului de biosinteză, diametrul coloniei fiind singurul criteriu de evaluare al potențialului hidrolitic. Utilizarea substraturilor cromogene insolubile pe bază de azurină, AZCL-HE Cellulose și AZCL-Xylan, permit dezvoltarea unei zone clare de hidroliză al substratului (figura 2.17).

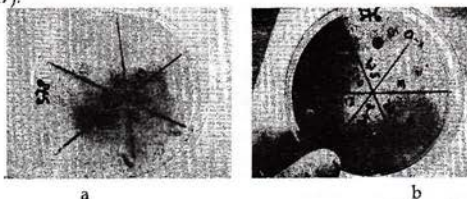


Figura 2.17 Evidențierea producerii de hemiceluloze prin metoda utilizării substraturilor cromogene insolubile: a.inițial; b.după dezvoltarea streptomicetelor și biosinteza de enzime extracelulare



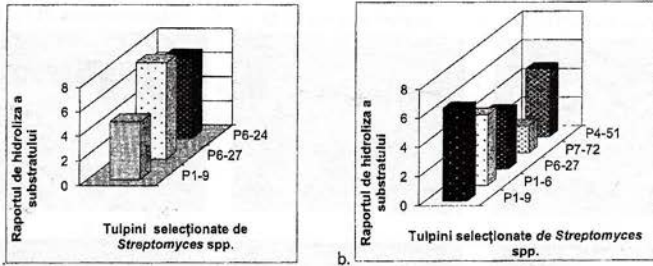


Figura 2.21 Confirmarea potențialului tulpinilor selecționate de *Streptomyces* spp. de a produce xilanaze prin cultivare pe mediul Gauze-xilan-agar suplimentat cu 0,05% AZCL-Xylan obținut din glume de ovăz (a) și AZCL-Xylan obținut din lemn de mesteacăn (b)

Așa cum se poate observa din figura 2.22 tulpina codificată P12-137 prezintă cel mai ridicat potențial de hidroliză a substratului xilan, într-un timp de cultivare de 264 h. De remarcat, este și capacitatea cea mai bună de adaptare a acestei tulpini care se dezvoltă și sintetizează xilanaze în ritm exponențial încă din primele ore de cultivare, comparativ cu celelalte două tulpini cu potențial de biosinteză mult diminuat și o fază prelungită de lag în cazul tulpinii codificată P7-72.

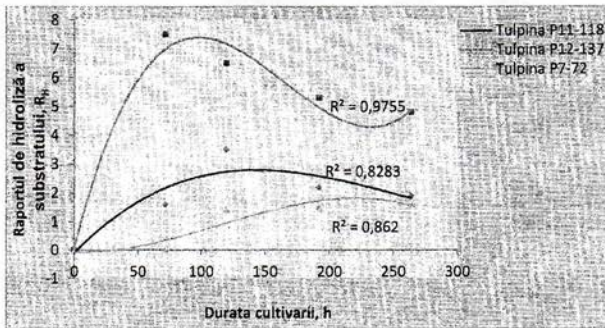


Figura 2.22 Dinamica de hidroliză a substratului xilan a tulpinilor de streptomicete selecționate. Datele reprezintă media a douăsprezece culturi realizate în paralel

### Caracterizarea morfofiziologică a tulpinilor selecționate cu activitate xilanazică

S-a realizat prin cultivarea pe mediul Gauze - agar. Au fost analizate forma, culoarea coloniilor obținute. Caracteristicile microscopice ale coloniilor au fost studiate prin analiză stereomicroscopică și microscopică.

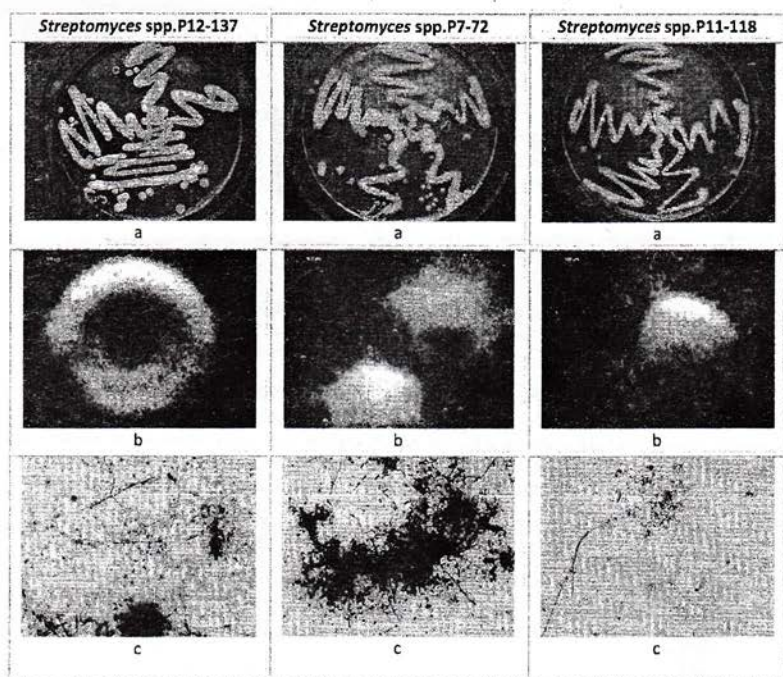


Figura 2.23 Caracterile morfologice ale tulpinilor selecționate. a-creștere pe mediu cu agar; b-imagini stereomicroscop 35x; c-imagini preparat microscopic observat la microscop 1500x

Evaluarea potențialului tulpinilor selecționate de a sintetiza enzime glicozid-hidrolazice de tip xilanazic în condiții de cultivare submersă

Studiul comparativ al biosintezei enzimelor xilanolitice de către cele trei tulpini selecționate în urma etapei de selecție calitativă, relevă un maxim de producție a enzimelor xilanazice după 96 de ore de cultivare, pentru tulpina *Streptomyces* spp. P12-137 cu o activitate de  $8,30 \text{ UA} \cdot \text{ml}^{-1}$ , după 144 de ore de cultivare pentru tulpina *Streptomyces* spp. P7-72 cu o activitate de  $5,30 \text{ UA} \cdot \text{ml}^{-1}$  și respectiv  $4,70 \text{ UA} \cdot \text{ml}^{-1}$  pentru tulpina *Streptomyces* spp. P11-118 după 120 de ore de cultivare (figura 2.26).

În ceea ce privește producția de celuloză, se observă un nivel minim de biosinteză a acestor enzime pentru toate cele trei tulpini analizate. Se observă un nivel maxim al celulozelor după 180 h în cazul tulpinii *Streptomyces* spp. P7-72, de  $2,36 \text{ UA} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Pentru tulpina cu cea mai mare productivitate de biosinteză a xilanazei, *Streptomyces* spp. P12-137, randamentul maxim de

biosinteză a celulozelor este atins după 200 h de cultivare, deci după faza de biosinteză a xilanazelor, iar activitatea celulozică este destul de redusă de 1,15 UA · ml<sup>-1</sup> (figura 2.27).

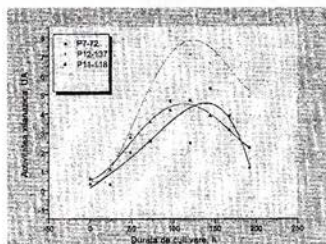


Figura 2.26 Dinamica bioproducerii de xilanaze la tulpinile de *Streptomyces* spp. selecționate în condiții de cultivare submersă la temperatura de 28°C pe mediul cu xilan din 1% mesteacăn ca unică sursă de carbon

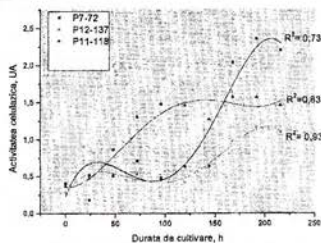


Figura 2.27 Dinamica de biosinteză a celulozelor la tulpinile selecționate de streptomicete prin cultivare în condiții submersă la temperatura de 28°C pe mediul cu 1% xilan din mesteacăn ca unică sursă de carbon

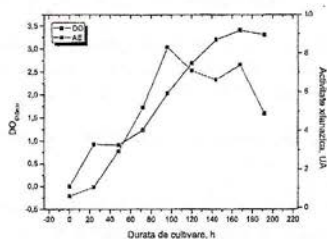


Figura 2.29 Dinamica de creștere și biosinteză a xilanazelor la tulpina *Streptomyces* spp. P12-137 în sistem submers de cultivare pe mediul de referință cu xilan de mesteacăn și sulfat de amoniu. Datele reprezintă media determinărilor realizate în triplicat

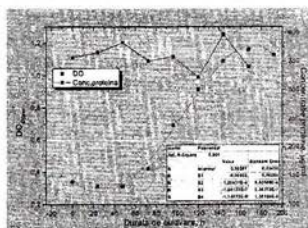


Figura 2.30 Dinamica de creștere și evoluția concentrației de proteine în mediul fermentativ la cultivarea în sistem submers a *Streptomyces* spp. P12-137

Pentru tulpina cea mai performantă P12-137 corelând dinamica de creștere cu producția de xilanază, se observă în figura 2.29 că maximum de biosinteză se atinge în faza de înmulțire exponențială, în momentul în care substratul este utilizat drept sursă de carbon cu rol structural și



265831

energetic. Curba de producție a xilanazei prezintă două maxime, unul după 96 de ore de cultivare și altul după 168 de ore, sugerând faptul că este posibil să se sintetizeze un complex de enzime cu acțiune succesivă.

În figura 2.30, comparând curba de acumulare a proteinelor în mediul fermentativ și dinamica de creștere a tulpinii *Streptomyces* spp. P12-137, se observă un maxim al concentrației de proteină în intervalul 120...168 de ore de cultivare care corespunde cu perioada de biosinteză a xilanazei și cu finalul fazei de multiplicare exponențială a celulelor.

#### Concluzii parțiale

1. S-au izolat un număr de 126 culturi pure de actinomicete aparținând genului *Streptomyces* spp., din diferite probe de sol recoltate din 4 județe : Galați, Constanța, Tulcea, Alba.
2. Tulpinile de streptomicete izolate au fost diferențiate pe baza caracterelor culturale prin cultivare pe mediul Gauze-1% amidon-agar în concordanță cu datele prezentate de Wendisch și Kutzner 1992 în International Streptomyces Project (ISP).
3. Din cele 126 de tulpini testate, 23% au prezentat activitate celulozolică, 12% au prezentat activitate xilanolică și 63% au avut activitate complexă celulozolică și xilanolică.
4. Tulpina *Streptomyces* spp. P12-137, s-a dovedit cea mai performantă pentru producerea de xilanaze.
5. S-a aplicat tehnica de selecție calitativă prin utilizarea substraturilor cromogenice insolubile conținând 0,05% AZCL (azurine cross-linkate), ceea ce a permis creșterea eficienței selecției semicantitative și evaluarea potențialului de biosinteză a hidrolazelor extracelulare pe baza indicelui de hidroliză, definit ca raportul dintre diametrul zonei de hidroliză a substratului, clar evidențiat și diametrul coloniei.
6. Extinderea utilizării substraturilor cromogenice pentru selecția enzimelor extracelulare este profitabilă din punct de vedere economic, reducând etapele de lucru, manopera în laborator și, de asemenea, necesarul de reactivi și ustensile.
7. În urma studiului comparativ al capacității de biosinteză a enzimelor glicozid-hidrolazice de tip xilanazic, s-a evidențiat tulpina *Streptomyces* spp. P12-137 cu o activitate xilanazică de 8,30 UA·ml<sup>-1</sup>, urmată de tulpina *Streptomyces* spp. P7-72 cu 5,30 UA·ml<sup>-1</sup> și tulpina *Streptomyces* spp. P11-118 cu 4,70 UA·ml<sup>-1</sup>.
8. Studiul comparativ al capacității de biosinteză a celulelor a situat pe primul loc tulpina *Streptomyces* spp. P7-72 cu 2,36 UA·ml<sup>-1</sup>, urmată de *Streptomyces* spp. P11-118 cu 1,5 UA·ml<sup>-1</sup> și tulpina *Streptomyces* spp. P12-137 cu un nivel de 1,15 UA·ml<sup>-1</sup>.
9. S-au studiat și optimizat parametrii procesului de obținere a glicozid-hidrolazelor de tip xilanazic prin cultivarea în condiții de laborator și micropilot a tulpinii selecționate *Streptomyces* spp. P12-137. În vederea obținerii unei productivități crescute în enzimă, se recomandă cultivarea în condiții de agitare la 150-200 rpm, temperatura de 28°C, pH 6,0, un timp de cultivare de 120 ore și a unui inocul sporifer în concentrație de 5%.

#### Capitolul 3 - Optimizarea compoziției mediului fermentativ pentru inducerea biosintezei de xilanaze libere de celule

Microorganism : Tulpina selecționată: *Streptomyces* spp. P12-137

Reactivi utilizați: Hidroxid de sodiu NaOH; tartrat dublu de sodiu și potasiu C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>KNa·4H<sub>2</sub>O, acid 3,5-dinitrobenzoic (DNS); acid acetic CH<sub>3</sub>COOH; acetat de sodiu C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na·3H<sub>2</sub>O; xilan din

mesteacăn (Carl Roth GmbH); carboximetilceluloză; L(-) - xiloză (Merck); reactivi utilizați pentru prepararea mediilor de cultură.

**Medii de cultură:** Au fost utilizate medii de cultură pentru reactivarea și conservarea culturilor stoc și medii de cultură utilizate la optimizarea compoziției acestora în vederea obținerii unor productivități crescute în xilanaze.

**Echipamente:** a fost utilizată infrastructura de cercetare existentă în cadrul Platformei de formare și cercetare interdisciplinară „BIOALIMENT” ([www.bioaliment.ugal.ro](http://www.bioaliment.ugal.ro)).

- Spectrofotometrul UV-VIS Jenway 6505, Jenway;
- Shaker orbital Optic Ivymen Sistem, Lab Companion;
- Shaker Medline SI-300R, Jeio Tech;
- Baia de apă Julabo F 33, Julabo;
- Autoclav Raypa AE 75 Dry, Respinar, SL;
- Balanța analitică Mettler Toledo XS Excellence, Mettler Toledo;
- pH-metrul Mettler Toledo;
- Centrifugă Hettich Zentrifugen Universal 320 R, Hettich;
- Centrifugă Hettich Mikro 22R, Hettich;
- Nișă cu flux laminar, Cruma;
- Etuvă cu convecție naturală 115L, model ED 115, Binder;
- Vortex VI plus, Boeco;
- Bioreactor de laborator 1 L pentru culturi de microorganisme Applikon Biobundle.

#### Metode de analiză

- Determinarea glucidelor reducătoare
- Determinarea proteinelor prin metoda Lowry
- Determinarea activității xilanazice și celulazice
- Determinarea surselor de carbon utilizate de tulpina selecționată *Streptomyces* spp. P12-137 folosind sistemul de identificare Biolog GP/GP2
- Testarea efectului unor surselor de carbon asupra creșterii streptomicetelor și bioproducerii glicozid-hidrolazelor
- Determinarea sursei optime de carbon
- Determinarea sursei optime de azot
- Metoda suprafeței de răspuns pentru optimizarea compoziției mediilor de cultură
- Analiza comportamentului biotehologic prin cultivare pe agitator și în bioreactor
- Metode de prelucrare și interpretare a datelor experimentale

#### Rezultate și discuții

##### Evaluarea efectului calitativ și cantitativ al surselor de carbon asupra creșterii streptomicetelor selecționate și biosintezei de xilanază

Identificarea surselor de carbon utilizate de tulpina selecționată *Streptomyces* spp. P12-137 cu ajutorul sistemului Biolog GP/GP2 a pus în evidență o multitudine de surse reprezentate de oligo și poliglucide, compuși metilați ai monoglucidelor, acizi organici, polialcooli, compuși fosfolucidici (figura 3.3).

Se observă o asimilare mai slabă a xilozei ceea ce confirmă experimentul anterior (figura 3.2) și o bună asimilare a arabinozei. Concentrația de xiloză din sistemul Biolog GP/GP2 este posibilă să depășească concentrația limită de la care începe inhibiția creșterii.

A1 Mălar	A2 D-Cydoberotin	A3 D-Cytosarzin	A4 D-Glicin	A5 D-Glycogen	A6 Maltin	A7 Mannan	A8 Terenol	A9 Terenol	A10 Polihidro-D-Gluconat	A11 D-Adeno-D-G. Maltozamin	A12 Amigdalit
B1 L-Arabinoză	B2 D-Arabitol	B3 Arbutin	B4 D-Celuloză	B5 D-Fruktoză	B6 L-Fucoză	B7 D-Galactoză	B8 D-Gluconic Acid	B9 Gentiozoză	B10 D-Gluconic Acid	B11 D-D-Glucosă	B12 Inulin
C1 D-Lactoză	C2 Lactuloză	C3 Maltosă	C4 Maltotrioză	C5 D-Mannitol	C6 D-Melibioză	C7 Sakharoză	C8 D-Sakharoză	C9 D-Metihydro-D-Galactoză	C10 D-Metihydro-D-Galactoză	C11 D-Metihydro-D-Galactoză	C12 Inulin
D D-Metihydro-D-Galactoză	D3 D-Metihydro-D-Galactoză	D4 Maltosă	D5 D-Melibioză	D6 D-Melibioză	D7 L-Fruktosă	D8 L-Fruktosă	D9 D-Galactoză	D10 D-Galactoză	D11 D-Galactoză	D12 D-Galactoză	D13 D-Galactoză
E1 D-Galactoză	E2 D-Fruktosă	E3 Terenol	E4 Maltin	E5 D-Glicin	E6 Maltin	E7 Maltin	E8 Maltin	E9 Maltin	E10 Maltin	E11 Maltin	E12 Maltin
F1 Lactulid	F2 D-Lactid Acid Methyl Ester	F3 L-Lactid Acid	F4 D-Lactid Acid	F5 L-Lactid Acid	F6 D-Lactid Acid Methyl Ester	F7 Lactid Acid Methyl Ester	F8 Lactid Acid	F9 Lactid Acid	F10 Lactid Acid	F11 Lactid Acid	F12 Lactid Acid
G1 Lactid Acid	G2 D-Alanin	G3 L-Alanin	G4 L-Alanin	G5 L-Alanin	G6 L-Alanin	G7 L-Alanin	G8 L-Alanin	G9 L-Alanin	G10 L-Alanin	G11 L-Alanin	G12 L-Alanin
H1 Adonin	H2 D-Onon	H3 Onon	H4 Thyridin	H5 Uridin	H6 Adonin	H7 Thyridin	H8 Uridin	H9 Adonin	H10 D-Onon	H11 D-Onon	H12 D-Onon

(c)

Figura 3.3 Sursele de carbon utilizate de tulpina *Streptomyces* ssp. P12-137 evidențiate cu GP2 Microplate BIOLOG. (a) aspectul plăcii inițial, (b) aspectul plăcii după termostatare la temperatura de 30°C, (c) Gria de interpretare a rezultatelor privind asimilarea surselor de carbon ● Pozitiv intens, ⊕ Pozitiv, ⊖ Slab pozitiv

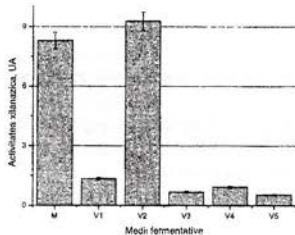


Figura 3.4 Efectul sursei de carbon asupra biosintezei de xilanază la tulpina *Streptomyces* ssp. P12-137. M-martor, V1-mediul cu 1% coceni de porumb V2- mediul cu 1% tărâțe de grâu, V3-mediul cu 1% paie de grâu, V4- mediul cu 1% rumeguș de lemn, V5- mediul cu 1% carboximetilceluloză

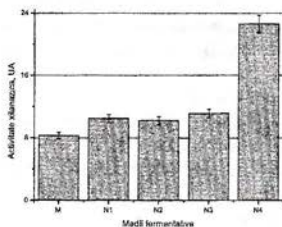


Figura 3.5 Efectul sursei de azot asupra biosintezei de xilanază de către *Streptomyces* ssp. P12-137. M -mediul martor, N1- mediul cu 1% peptonă, N2- mediul cu 0,2% uree, N3- mediul cu 0,5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N4- mediul cu 0,5% KNO<sub>3</sub>

Optimizarea compoziției mediului fermentativ prin modelare matematică (metoda suprafeței de răspuns)

Pentru optimizarea compoziției mediului fermentativ în vederea obținerii unei producții superioare de xilanaze extracelulare cu ajutorul streptomicetelor s-a utilizat un model experimental factorial  $2^3$  cu compoziție centrală (CCD „Central Composite Design”) cu 3 factori, 5 niveluri și 5 puncte centrale. Modelul experimental CCD a impus conceperea a 15 variante experimentale, și a inclus 4 puncte de proiectare factorială, 6 puncte pentru studii axiale (2 pentru fiecare variabilă) și 5 studii pentru replicarea punctelor centrale. Pentru toate variabilele s-a considerat valoarea centrală codificată zero. Intervalele maxime și minime ale variabilelor investigate în planul experimental în formă actuală și în formă codificată sunt prezentate în tabelul 3.1. Activitățile xilanazică și celulozică, ca medii a trei determinări, au fost considerate drept variabile dependente sau de răspuns.

Tabelul 3.1 Nivelurile și intervalele de variație ale variabilelor independente utilizând CCD

Variabila independentă	Nivelul codificat al variabilei				
	- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
Tărâțe de grâu (%w/v) A	0,80	1,00	1,50	2,00	2,20
KNO <sub>3</sub> (%w/v) B	0,04	0,20	0,60	1,00	1,16
Xiloză (%w/v) C	0,02	0,10	0,30	0,50	0,78

Tabelul 3.2 Matrice experimentală de variație a variabilelor

Nr. experim.	Niveluri codificate			Niveluri actualizate, g%		
	A	B	C	A	B	C
1	0	0	0	1,5	0,6	0,3
2	+1	+1	-1	2	1	0,02
3	+1,41	0	0	2,2	0,6	0,3
4	-1,41	0	0	0,8	0,6	0,3
5	0	-1,41	0	1,5	0,04	0,3
6	0	0	0	1,5	0,6	0,3
7	+1	-1	+1	2	0,2	0,5
8	0	0	0	1,5	0,6	0,3
9	-1	+1	+1	1	1	0,5
10	0	0	-1,41	1,5	0,6	0,02
11	-1	-1	-1	1	0,2	0,1
12	0	0	0	1,5	0,6	0,3
13	0	+1,41	0	1,5	1,16	0,3
14	0	0	+1,41	1,5	0,6	0,58
15	0	0	0	1,5	0,6	0,3

Cele 15 experimente s-au realizat prin obținerea variantelor de mediu fermentativ conform matricei experimentale (tabelul 3.2), inocularea în proporție de 5% cu inocul mixt și cultivarea la temperatura de 28°C, la 150 rpm, timp de 120 ore (5 zile).

Pentru analiza modelului experimental s-a utilizat pachetul software statistic „Design-Expert 7.0”, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA. Rezultatele au fost modelate utilizând ecuația polinomială de ordinul doi, de forma:

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC + A^2 + B^2 + C^2 \quad (3.1)$$

unde: Y - răspunsul predicționat;  $\beta_0$  - coeficientul de regresie;  $\beta_1, \beta_2, \beta_3$  - coeficienți liniari;  $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$  - coeficienți de interacțiune; A, B, C - factori experimentali (tărâțe de grâu, KNO<sub>3</sub>, xiloză).

Pentru estimarea parametrilor statistici s-a aplicat analiza variației ANOVA. Relevanța modelului s-a apreciat și pe baza coeficientului multiplu de determinare R<sup>2</sup> (similar coeficientului de regresie).

#### Modelarea producerii de xilanază

**Tabelul 3.9** Matricea modelului compoziției centrale pentru variabilele independente în valori codificate și activitatea xilanazică (răspuns)

Nr.exp.	Variabile independente			Activitatea xilanazică, UA × ml <sup>-1</sup>	
	A	B	C	Experimentale	Predicționate
1	0	0	0	6,23	8,02
2	+1	+1	-1	2,52	1,2
3	+1,41	0	0	9,98	11,3
4	-1,41	0	0	10,69	9,37
5	0	-1,41	0	15,99	17,31
6	0	0	0	9,17	8,02
7	+1	-1	+1	13,4	12,08
8	0	0	0	12,27	8,02
9	-1	+1	+1	27,77	26,45
10	0	0	-1,41	4,8	6,12
11	-1	-1	-1	10,69	9,37
12	0	0	0	5,88	8,02
13	0	+1,41	0	9,23	10,55
14	0	0	+1,41	6,51	7,83
15	0	0	0	9,22	8,02

Ecuația care descrie modelul adecvat pentru biosinteza de xilanază este următoarea:

$$Y = 8.67 \cdot A - 0.44 \cdot B + 29.61 \cdot C - 31.93 \cdot AB - 39.40 \cdot AC + 67.29 \cdot BC + 7.26 \cdot A^2 + 18.47 \cdot B^2 - 13.09 \cdot C^2 - 1.07$$

unde:

Y - randamentul de biosintează, UA · ml<sup>-1</sup>; A - concentrația de tărâțe de grâu, g%;



B - concentrația de  $KNO_3$ , g%; C - concentrația de xiloză, g%.

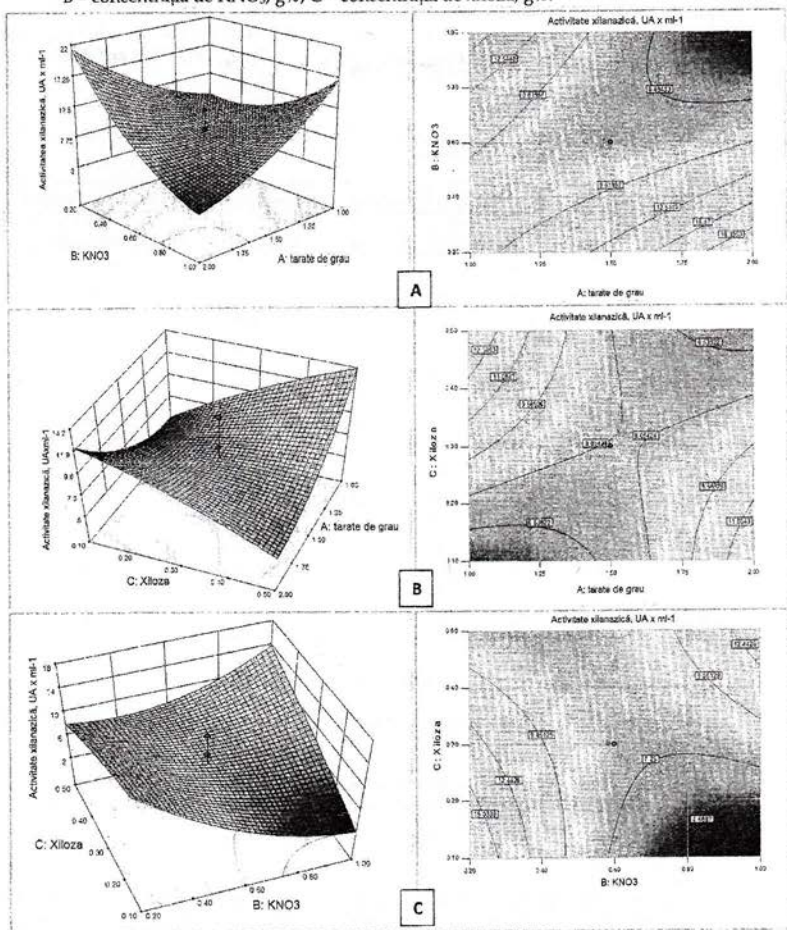


Figura 3.7 Suprafețele de răspuns (stânga) și graficele de contur (dreapta) ce descriu efectele cantitative, corelative ale tărâței de grâu, g% și  $KNO_3$ , g% (A), tărâței de grâu, g% și xilozei, g% (B),  $KNO_3$ , g% și xilozei, g% (C) asupra randamentului de biosinteză a xilanazei la tulpina selecționată *Streptomyces* spp. P12-137

În urma modelării matematice a procesului de bioproducere a xilanazei a rezultat compoziția optimă a mediului de biosinteză ( $g \cdot l^{-1}$ ): tărâță de grâu 20;  $K_2HPO_4$  0,075;  $KH_2PO_4$  1,5;  $KNO_3$  2; xiloză 1,0; soluție bioelemente 2,7  $ml \cdot l^{-1}$ ; pH = 7,0...7,2. Compoziția soluției de bioelemente ( $g \cdot l^{-1}$ ):  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,14;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0,16;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5;  $CoCl_2 \cdot 2H_2O$  0,2; apă distilată 1000 ml.

Modelarea producerii de celulază

**Tabelul 3.11** Matricea modelului compoziției centrale pentru variația celor trei variabile în valori codificate și răspunsurile în valori experimentale și predicționate

Nr.exp.	Variabile independente			Randament de biosinteză, UA $\times ml^{-1}$	
	A	B	C	Valori experimentale	Valori predicționate
1	0	0	0	1,65	1,24
2	+1	+1	-1	0,47	0,44
3	+1,41	0	0	0,69	0,72
4	-1,41	0	0	1,63	1,66
5	0	-1,41	0	1,09	1,12
6	0	0	0	1,95	1,24
7	+1	-1	+1	2,08	2,05
8	0	0	0	1,28	1,24
9	-1	+1	+1	1,02	1,05
10	0	0	-1,41	1,26	1,29
11	-1	-1	-1	1,29	1,26
12	0	0	0	0,88	1,24
13	0	+1,41	0	1,38	1,41
14	0	0	+1,41	1,02	1,05
15	0	0	0	0,51	1,24

Ecuția modelului pătratic obținută pentru biosinteza de celulază este:

$$Y = 1,71 - 0,79A + 4,80B - 5,50C - 2,09AB + 5,73AC - 4,90BC - 0,11A^2 + 0,06B^2 - 0,94C^2$$

în care:

Y = randamentul de biosinteză a celulei, UA  $\times ml^{-1}$ ;

A = concentrația de tărâță de grâu, g %;

B = concentrația de  $KNO_3$ , g %;

C = concentrația de xiloză, g %.

Cel mai redus randament de celulază de 0,47 UA  $\cdot ml^{-1}$  s-a obținut pentru varianta experimentală nr.2 în care concentrațiile de tărâță de grâu,  $KNO_3$  și xiloză sunt de 2 g%, 1 g% și respectiv 0,1 g%. Compoziția mediului fermentativ optimizat pentru obținerea unei producții minime de celule ( $g \cdot l^{-1}$ ): tărâță de grâu 20;  $K_2HPO_4$  0,075;  $KH_2PO_4$  1,5;  $KNO_3$  2; xiloză 1; soluție bioelemente 2,7  $ml \cdot l^{-1}$ ; pH = 7,0...7,2. Se observă că acest mediu are compoziție similară cu cel recomandat pentru producerea cu randament sporit a xilanazei. Aceste rezultate sunt extrem de importante pentru

obținerea de xilanaze libere de celuloze, preparate enzimatic cu aplicații în industria celulozei și hârtiei.

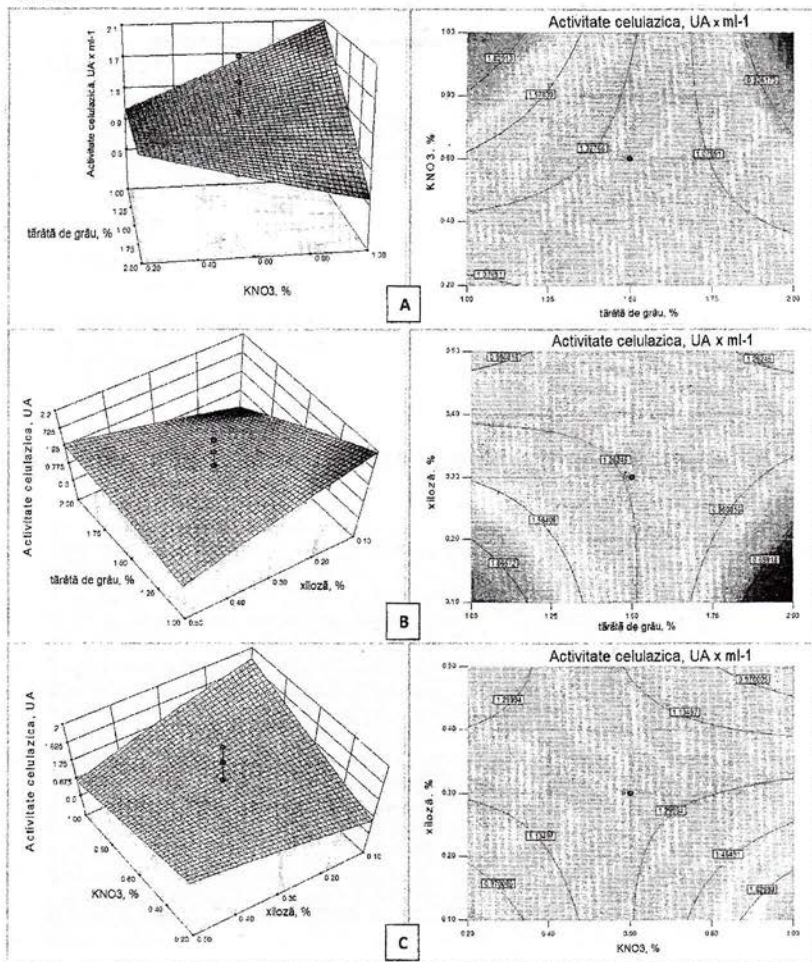


Figura 3.13 Suprafețele de răspuns (stânga) și graficele de contur (dreapta) ce descriu efectul cantitativ al tărâței de grâu, g% și KNO<sub>3</sub>, g% (A), tărâțe de grâu, g% și xilozei, g% (B), KNO<sub>3</sub>, g% și xilozei, g% (C) asupra producției de celuloze de către tulpina *Streptomyces* spp. P12-137

Comportamentul biotehnologic al tulpinii selectate prin cultivare pe mediul optimizat

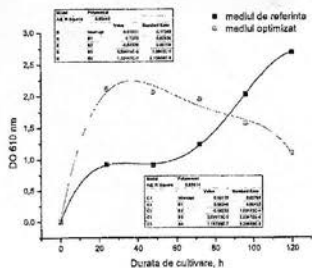


Figura 3.18 Dinamica de creștere a tulpinii *Streptomyces* spp. P12-137 prin cultivare în sistem submers pe mediul de referință și mediul optimizat

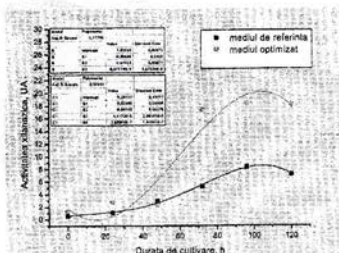


Figura 3.19 Cinetica biosintezei de xilanază de către tulpina *Streptomyces* spp. P12-137 prin cultivare în sistem submers pe mediul de referință și mediul optimizat

Testarea comportamentului biotehnologic al tulpinii *Streptomyces* spp. P12-137 în condiții pilot

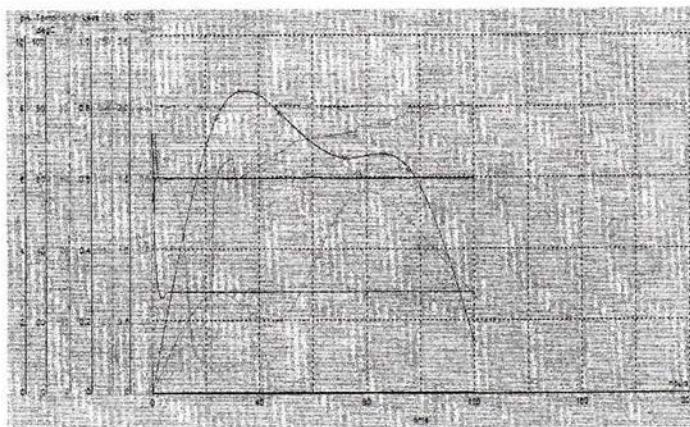


Figura 3.22 Parametri biotehnologici înregistrați la cultivarea în bioreactor, pe mediul fermentativ optimizat, la temperatura de 28°C, pH 6,0, agitare 200 rpm, aerare 1 vol.aer/vol.mediu, timp de cultivare de 120 de ore. Controlul procesului cu software-ul BioXpert Lite

Cultivarea submersă s-a realizat în bioreactorul Applikon Biobundle 1 litru aflat în dotarea Laboratorului de Bioprocese și Fermentații din cadrul Platformei „Bioaliment” (figura 3.20; figura 3.21). Procesul este controlat prin senzori specifici cu care este echipat aparatul. În plus, s-au monitorizat doi parametri importanți,  $DO_{610\text{ nm}}$  și activitatea xilanazică, a căror valori obținute sunt prezentate în tabelul 3.13.

Tabelul 3.13 Parametrii biotehnologici la cultivarea în bioreactorul Applikon Biobundle, 1L

Durata de cultivare, h	Grad de dezvoltare a biomasei $\frac{D}{D_0}$	Activitate xilanazică UA
0	0	0
24	1,92	1,39
48	1,95	1,02
72	1,64	2,64
96	1,56	2,39
120	0,35	1,34

\* densitatea optică a culturii la 610 nm

### Concluzii parțiale

1. Sursele de carbon din compoziția materialelor hemicelulozice exercită efecte diferite asupra creșterii tulpinilor diferite de streptomicete. Astfel, s-a evidențiat efectul stimulator al rafinozei, manozei și xilitolului, în concentrații de 2%.
2. Pentru a formula un mediu de biosinteză avantajos și ieftin în vederea utilizării în condiții de stație pilot și la nivel industrial, au fost concepute și testate 5 variante de mediu pentru stabilirea sursei optime de carbon și 4 variante pentru stabilirea sursei optime de azot.
3. Biosinteza glicozid-hidrolazelor de tip xilanazic de către streptomicetele se realizează cu randament superior în medii cu 1,0 g % tărâțe de grâu în calitate de sursă de carbon bogată în hemiceluloze, 0,2g % azotat de potasiu, drept sursă optimă de azot și 0,1g % xiloză cu rol de inductor.
4. Randamentul maxim de biosinteză a xilanazei se obține în condițiile în care raportul optim între sursa de carbon și cea de azot este de 1:1.
5. Xiloză poate exercita un rol de represor catabolic în reglajul genetic al transcripției genei pentru xilanază în concentrații mai mari de 0,5 g%.
6. Aplicarea metodei analizei suprafeței de răspuns cu compoziție centrală pentru optimizarea mediului fermentativ a permis obținerea unui model polinomial de regresie cu un coeficient de determinare de 0,90 adecvat și corelat cu datele obținute experimental.
7. Prin modelare matematică a fost posibilă reglarea procesului de biosinteză a enzimelor din complexul glicozid-hidrolazic în scopul obținerii de xilanaze libere de celulaze.
8. Mediul fermentativ optimizat pentru obținerea unui randament maxim de xilanază trebuie să conțină 2,0 g% tărâțe de grâu, 0,2 g%  $KNO_3$  și 0,1 g% xiloză. Minimizarea producerii de celulaze se obține la aceleași concentrații a celor trei surse nutritive.
9. Prin cultivarea tulpinii selecționate *Streptomyces* spp. P12-137 pe mediul optimizat ce conține 1:1:0,5 tărâță de grâu,  $KNO_3$  și xiloză, asigură obținerea unui randament de biosinteză a xilanazei de 27,77 UA·ml<sup>-1</sup>.
10. Compoziția mediului fermentativ optimizat pentru bioproducerea de xilanaze libere de celulaze este următoarea (g l<sup>-1</sup>): tărâțe de grâu 20,  $K_2HPO_4$  0,075,  $KH_2PO_4$  1,5,  $KNO_3$  2, xiloză

- 0,1, soluție bioelemente 2,7 ml · l<sup>-1</sup>. Soluția de bioelemente are următoarea compoziție (g · l<sup>-1</sup>): ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,14, Mn SO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0,16, Fe SO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,5, CoCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 0,2, apă distilată până la 1 l. Mediul optim permite obținerea unei producții maxime de xilanaze și minime de celuloze.
11. Studiul comparativ al potențialului de biosinteză a xilanazei a mediului optimizat comparativ cu mediul de referință a demonstrat o creștere de trei ori a productivității de xilanază în complexul enzimatic cu reducerea la minim a producerii de celuloze.
  12. La un volum util de mediu fermentativ de 700 ml, o temperatură de 28°C, o viteză de agitare de 200 rpm și o aerare de 1 vol.aer/vol.mediu x minut s-a înregistrat un randament maxim de biosinteză a xilanazei în bioreactor după 80 ore de cultivare pe mediul fermentativ cu compoziție optimizată.
  13. Tulpina selecționată ca activ producător de xilanază *Streptomyces* spp. P12-137 are un comportament biotehnologic adecvat în condiții de cultivare micropilot și reprezintă o tulpină de referință pentru transpunerea biotehnologiei la nivel industrial.

#### Capitolul 4 - Stabilirea condițiilor optime de recuperare, purificare și caracterizare a comportamentului catalitic a xilanazelor în sisteme model și pe substraturi naturale

**Microorganism:** Tulpina selecționată *Streptomyces* spp. P12-137.

**Mediul fermentativ optimizat** cu următoarea compoziție în g · l<sup>-1</sup>: tărâțe de grâu 20, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,075, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5, KNO<sub>3</sub> 10, xiloză 5,0, soluție microelemente 2,7 ml l<sup>-1</sup>. Soluția de microelemente are următoarea compoziție (g · l<sup>-1</sup>): ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,14, Mn SO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0,16, Fe SO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,5, CoCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 0,2, apă distilată până la 1 litru.

**Reactivi:**

- reactivi pentru purificarea enzimei
- reactivi pentru testarea activității enzimatic
- reactivi pentru caracterizarea enzimei

**Echipamente:**

- spectrofotometrul UV-VIS Jenway 6505, Jenway;
- shaker orbital Optic Ivymen Sistem, Lab Companion;
- shaker Medline SI-300R, Jeio Tech;
- baia de apă Julabo F 33, Julabo;
- autoclav Raypa AE 75 Dry, Respinar, SL;
- balanța analitică Mettler Toledo XS Excellence, Mettler Toledo;
- pH-metrul Mettler Toledo;
- centrifugă Hettich Zentrifugen Universal 320 R, Hettich;
- centrifugă Hettich Mikro 22R, Hettich;
- nișă cu flux laminar, Cruma;
- etuvă cu convecție naturală 115L, model ED 115, Binder;
- vortex VI plus, Boeco;
- concentrator sub vid, Martin Christ;
- sistemul de cromatografie HPLC: pompa JASCO PU-980, injector Rheodyne 7725i cu buclă de injecție de 20μl, cameră de termostatare coloane JETSTREAM, detector pe baza indicelui de refracție ERC-7515A. Coloana folosită a fost Coregel 87H3;
- linia de electroforeză Diamedix P8-1.1.

### Metode de analiză

- Precipitarea fracționată a proteinelor cu săruri neutre prin procedul „salting out”
- Determinarea proteinelor prin metoda Lowry
- Determinarea activității xilanazice și celulazice
- Determinarea glucidelor reducătoare
- Dializa fracțiunilor obținute prin precipitare cu sulfat de amoniu
- Caracterizarea xilanazelor prin electroforeză
- Caracterizarea proprietăților catalitice ale preparatului enzimatic parțial purificat cu activitate xilanazică
- Determinarea spectrului de hidroliză enzimatică a xilanului prin cromatografia HPLC
- Hidroliza enzimatică a xilanului din paie de grâu pentru obținerea de xilo-oligoglucide cu rol de protecție

### Rezultate și discuții

Purificarea parțială a xilanazei sintetizată de tulpina selecționată *Streptomyces* spp. P12-137 prin procedul „salting out”

Tabelul 4.1 Purificarea preparatului xilanazic prin precipitare cu sulfat de amoniu

Fracțiunea	Saturație sulfat de amoniu, %	Volum extract, ml	Proteine, mg	Activitate enzimatică, UA	Activitate specifică UA/mg proteină	Factor de purificare	Randament de purificare
Extract brut	-	20	0,124	1,349	10,884	1	100
F1	40	6	0,022	0,417	18,955	1,74	30,91
F2	50	5	0,019	0,489	25,737	2,36	36,25
F3	55	5	0,018	0,554	30,777	2,83	41,07
F4	60	5	0,023	0,574	24,957	2,29	42,55
F5	65	5	0,018	0,818	45,444	4,18	60,63
F6	80	5,5	0,027	0,985	36,481	3,35	73,02
F7	90	6	0,027	0,333	12,330	1,13	24,68

Eficiența purificării s-a estimat prin calculul activității specifice calculată ca raport între activitatea enzimatică și conținutul de proteine din extractul enzimatic. Aceasta înregistrează o creștere pe parcursul etapelor de purificare devenind maximă și constantă pentru enzima în stare pură. Înainte de a se realiza precipitarea, preparatul enzimatic brut a fost concentrat de 13 ori în concentratorul rotativ sub vid Martin Christ. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 4.1.

Enzima nu precipită într-un domeniu strict al concentrațiilor, ea fiind repartizată în mai multe fracții însă cele mai mari concentrații se obțin la saturații de 65% și 80%.

Fracțiunea cea mai activă F5, pentru care factorul de purificare este cel mai mare (4,18), corespunde la 65% saturație. În acest caz s-a obținut un randament de recuperare a enzimei de 60,63%. Activitate xilanazică semnificativă a fost evidențiată și în fracțiunea F6, obținută prin precipitare în prezența a 80% saturație  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , (figura 4.6)

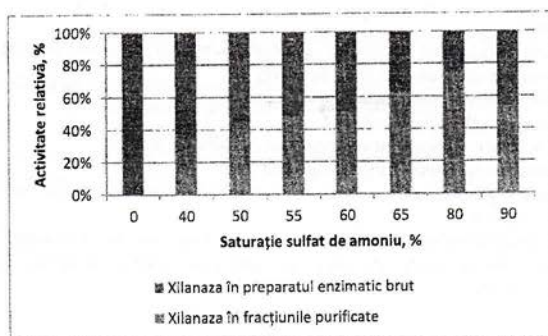


Figura 4.6 Recuperarea xilanazei prin precipitare cu sulfat de amoniu

Evidențierea proprietăților electroforetice ale xilanazei sintetizate de tulpina *Streptomyces* spp.P12-137

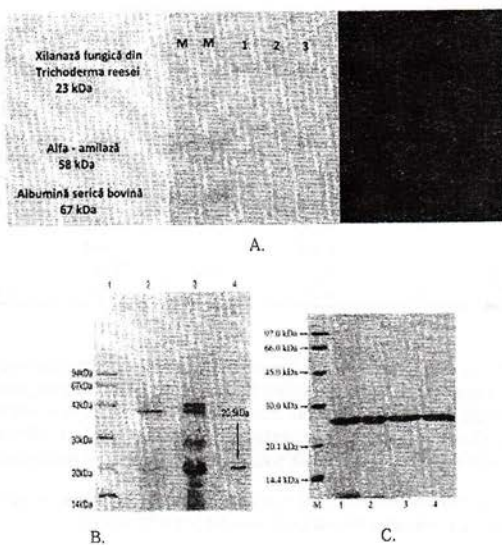


Figura 4.8 Proprietățile electroforetice ale xilanazei sintetizate de tulpina *Streptomyces* spp. P12-137 A) (1 - supernatant cultural 2 - precipitat sulfat de amoniu saturatie 65 % 3 - precipitat sulfat de amoniu saturatie 80 %, M - martori proteici) comparativ cu alte xilanaze descrise în literatură; B) *Streptomyces cyaneus* SN30 (Yan et al., 2008); C) *Paecilomyces thermophila* J18 (Li et al., 2005)



S-a utilizat electroforeza clasică utilizând ca suport folii de acetat de celuloză. După 30 minute de migrare și dezvoltarea electroforegramei s-a evidențiat prezența unei benzi unice atât pentru cele 2 fracțiuni purificate prin precipitare (poziția 2, 3) cât și pentru extractul brut (poziția 1) (figura 4.8). În toate cele trei cazuri benzile vizibile corespund cu xilanaza obținută din *Trichoderma reesei*, cu greutatea moleculară de 23 kDa. Lipsa altor benzi relevă faptul că atât fracțiunile prepurificate cât și extractul brut conțin proteine de balast probabil cu masă moleculară mai mare decât zona de electroforeză testată.

Valoarea greutății moleculare de 23 kDa este similară cu a multor altor xilanaze din familia 11 care au fost descrise în literatură, cuprinse între 20...26,5 kDa (Yan et al., 2008). Ninave et al., 2008 au obținut o xilanază prin cultivarea tulpinei *Streptomyces cyaneus* SN 30 pe substrat cu tărâțe de grâu (figura 4.8 B), pentru care prin electroforeză SDS-PAGE s-a evidențiat o singură bandă corespunzătoare unei greutăți moleculare de 20,5 kDa.

Aceste date confirmă că enzimele aparțin grupului 11 de xilanaze (enzime cu greutatea moleculară scăzută - proteine baze) în corelație cu clasificarea propusă de Wong et al. în 1988.

#### Evaluarea comportamentului catalitic al xilanazei parțial purificate

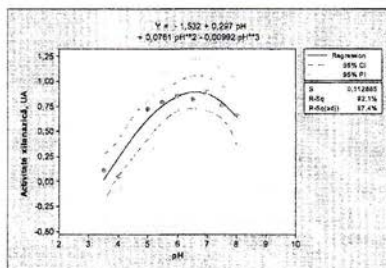


Figura 4.12 Efectul pH-ului asupra activității xilanazei sintetizate de *Streptomyces* spp. P12-137 separată prin precipitare cu sulfat de amoniu, 65% saturatie

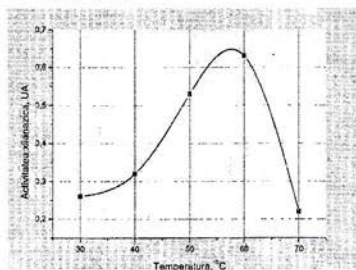


Figura 4.16 Variația activității xilanazei în funcție de temperatură (fracțiunea separată la 65% saturatie sulfat de amoniu)

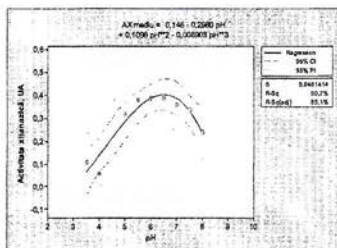


Figura 4.13 Efectul pH-ului asupra activității xilanazei sintetizate de *Streptomyces* spp. P12-137 separată prin precipitare cu sulfat de amoniu, 80% saturatie



Figura 4.17 Determinarea temperaturii optime de activitate pentru fracțiunea de enzimă parțial purificată la 80% saturatie sulfat de amoniu

Comportamentul cinetic al xilanazei parțial purificate

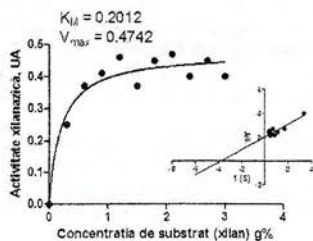


Figura 4.20 Variația vitezei de hidroliză a xilanului sub acțiunea xilanazei separată prin precipitare la 65% sulfat de amoniu. Corelația dintre viteza reacției de hidroliză a substratului și concentrația de substrat în reprezentarea Lineweaver-Burk (graficul din dreapta)

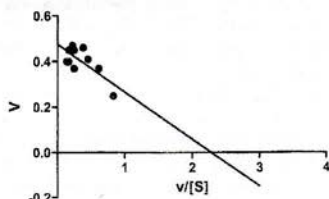


Figura 4.21 Corelația dintre viteza reacției de hidroliză a substratului și concentrația de substrat în reprezentarea Eadie - Hofstee

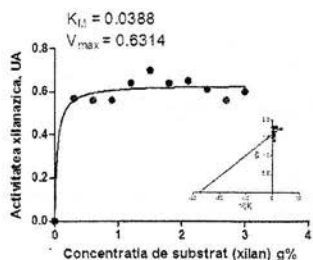


Figura 4.22 Variația vitezei de hidroliză a xilanului sub acțiunea xilanazei precipitate la 80% saturație sulfat de amoniu. Reprezentarea parametrilor cinetici a reacției de hidroliză a xilanului în conformitate cu modelul Lineweaver-Burk

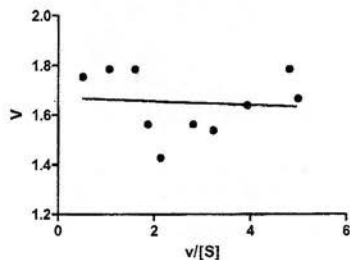


Figura 4.23 Corelația dintre viteza de hidroliză a xilanului și concentrația de substrat conform modelului Eadie-Hofstee

Analiza comportamentului catalitic al celor două fracțiuni cu activitate xilanazică, separate prin precipitare la saturații de 65% și 80% sulfat de amoniu, conduce la concluzia că cele două fracțiuni reprezintă izoenzime cu proprietăți ușor diferențiate. Existența celor două enzime a fost

predicționată și anterior prin evidențierea a două maxime de biosinteză a xilanazei după 96 h și 168 h de cultivare.

Comparând rezultatele obținute cu datele din literatura de specialitate se constată că xilanazele sintetizate de tulpina *Streptomyces* spp. P12-137 au activitate superioară și proprietăți catalitice ușor diferențiate comparativ cu enzimele obținute cu alte tulpini selecționate de streptomicete (tabelul 4.9).

**Tabelul 4.9** Proprietățile catalitice ale unor xilanaze descrise în literatură și ale enzimelor sintetizate de tulpina selecționată *Streptomyces* spp. P12-137

Microorganism	Substrat	Condiții de creștere	Activitate xilanazică, UI	Temperatura optimă, °C	pH optim	Timp de înjumătățire, h	Referințe bibliografice
<i>Thermoactinomyces thalophilus</i>	1% xilan + peptonă	50°C pH 8,5 4 zile	18	65	8,5	2,0 (65°C, pH 8,5)	Kahli et al., 2001
<i>Streptomyces</i> spp. QGI 13	tărâțe de grâu	37°C pH 8,0 5 zile	7,5	50	8,5	1,0 (50°C, pH 9,0)	Beg et al., 2000
<i>Streptomyces albus</i> ATCC 3005	1% xilan + extract de drojdie	30°C pH 7,5 5 zile	12	60	6,5	0,5 (55°C, pH 6,5)	Antanopoulos et al., 2001
<i>Streptomyces cuspidosporus</i>	1% xilan	37°C pH 7,5 5 zile	22	65	5,5	5,0 (55°C, pH 5,5)	Maheswari și Chandra, 2000
<i>Streptomyces roseiscleroticum</i>	1% xilan	37°C pH 7,5 5 zile	16	60	7,0	NR	Grabski și Jaffries, 1991
<i>Streptomyces</i> spp.	1% xilan 1% paie	NR NR	5 14	50 50	8,0 8,0	NR NR	Lumba și Peninuck, 1992
<i>Streptomyces</i> spp. Ab 106	1% xilan trestie de 1% zahăr	55°C pH 7,5 5 zile 55°C pH 7,5 5 zile	8 13	60 60	60 69	NR 6,0	Techapun et al., 2002
<i>Streptomyces</i> spp. P12-137 extract brut	2% tărâțe de grâu	28°C pH 6,0 5 zile	27,7 <sup>1</sup>	70	5,5	ND	-

ND – nedeterminat. <sup>1</sup> Activitatea xilanazică a fost exprimată în UA conform definiției

#### Comportamentul hidrolitic al preparatului xilanazic brut asupra substraturilor xilanazice

Din considerente de ordin economic, pe de o parte, și pentru a valorifica potențialul hidrolitic al enzimelor din complexul enzimatic brut, pe de altă parte, s-a studiat comportamentul enzimatic al preparatului xilanazic brut asupra xilanului comercial și a xilanului obținut din paie de grâu. În condiții optimizate de reacție s-a analizat prin cromatografie HPLC profilul compușilor de hidroliză al xilanului comercial (extras din mesteacăn) sub acțiunea preparatului xilanazic brut

sintetizat de tulpina *Streptomyces* spp. P12-137 după 96 h de cultivare în condiții fermentative optime.

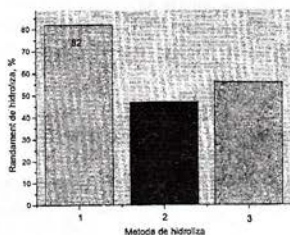


Figura 4.25 Randamentul de hidroliză al xilanului prin hidroliză acidă și enzimatică. 1. hidroliză acidă; 2. hidroliză cu exoxilanaza comercială; 3. hidroliză cu preparatul xilanazic brut *Streptomyces* spp. P12-137

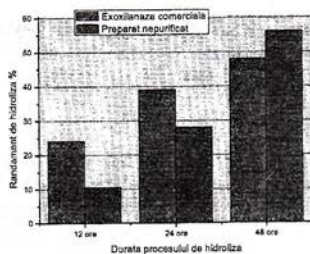


Figura 4.26 Dinamica de hidroliză enzimatică a xilanului obținut din paie de grâu (date obținute prin cromatografie HPLC)

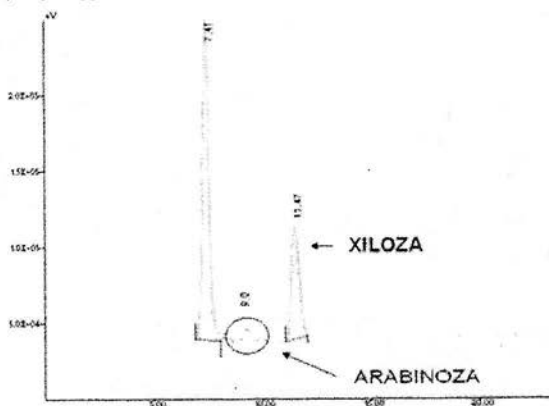


Figura 4.27 Cromatograma probei de xilan supusă hidrolizei acide

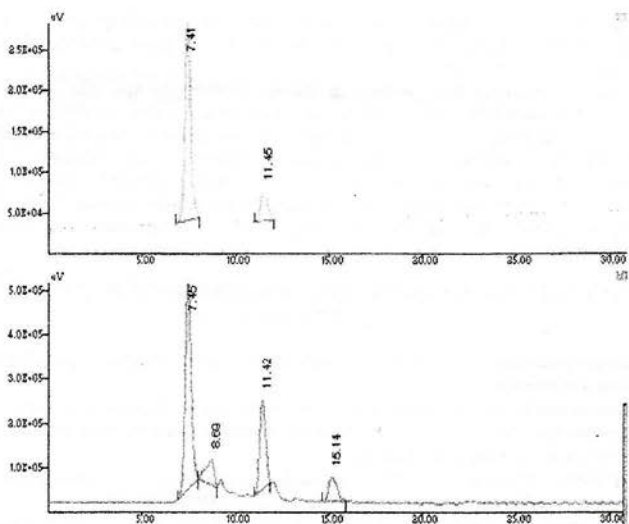


Figura 4.28 Cromatogramele HPLC ale hidrolizatorilor din xilan din paie sub acțiunea exo-xilanazei comerciale (sus) și preparatului xilanazic de *Streptomyces* spp. P12-137 brut nepurificat (jos), după 24 h de tratament

#### Concluzii parțiale

- 1 S-au studiat și optimizat condițiile de separare a fracțiunilor cu activitate xilanazică din preparatul enzimatic brut obținut prin cultivarea în condiții fermentative optime a tulpinii selecționate *Streptomyces* spp. P12-137.
- 2 Prin precipitare cu sulfat de amoniu s-au separat la saturații de 65% și 80% două fracțiuni active, obținându-se un grad de purificare al enzimei de 4,18. Cel mai mare randament de recuperare al enzimei s-a obținut la o saturație de 65% sulfat de amoniu, la care activitatea specifică este maximă 45,44 UA·mg<sup>-1</sup> proteină și randamentul de purificare de 60,63%.
- 3 Frațiunile active enzimatic separate prin precipitare cu sulfat de amoniu au comportament diferit în ceea ce privește condițiile catalitice de activitate optimă (pH, temperatură, stabilitate) și totodată acționează diferit comparativ cu preparatul enzimatic brut, ceea ce explică capacitatea tulpinii selecționate *Streptomyces* spp. P12-137 de a sintetiza un complex multienzimatic.
- 4 Proprietățile structurale și catalitice ale xilanazelor sintetizate de tulpina *Streptomyces* spp. P12-137 sunt similare cu ale altor enzime din această categorie sintetizate de streptomicete descrise în literatura de specialitate.
- 5 Potențialul de hidroliză a substratului xilan este superior în cazul xilanazelor sintetizate de tulpina *Streptomyces* spp. P12-137, fapt certificat prin analiza parametrilor cinetici ( $V_{max}$  și

$K_M$ ) și analiza cromatografică (HPLC) a produșilor de hidroliză comparativ cu produsele obținute prin hidroliza acidă sau prin acțiunea unui preparat comercial de exoxilanază fungică (*Trichoderma reesei*).

- 6 Preparatul enzimatic brut, obținut cu tulpina *Streptomyces* spp. P12-137 reprezintă un preparat ce poate fi recomandat pentru utilizare practică pentru modificarea substraturilor xilanazice naturale, cu implicații deosebite în bioconversia deșeurilor agroindustriale, prelucrarea materialelor hemicelulozice, obținerea de alimente funcționale. Xilooligoglucozidele obținute prin hidroliza xilanului pot fi utilizate în compoziția diferitelor produse alimentare (produse lactate, produse de panificație) datorită rolului de protecție asupra mucoasei colonului și de reglare a dezvoltării florei microbiene de la acest nivel.

## C.CONCLUZII GENERALE, ASPECTE ORIGINALE ȘI PERSPECTIVE DE CONTINUARE A CERCETĂRILOR

Concluziile generale care rezidă din studiile realizate în acord cu obiectivele științifice ale tezei de doctorat sunt următoarele:

- Streptomicetele, bacterii filamentose, larg răspândite în microbiota solurilor, reprezintă surse potențiale importante pentru obținerea enzimelor implicate în hidroliza substraturilor hemicelulozice (celulaze și xilanaze).
- Majoritatea tulpinilor de streptomicete izolate și testate au demonstrat capacitatea de a sintetiza complexe enzimatică cu activitate celulozolică și xilanolică.
- Prin optimizarea condițiilor fermentative este posibilă coordonarea mecanismului de biosinteză în sensul intensificării biosintezei unui tip de enzime în detrimentul altora, corelat cu aplicațiile practice ale preparatelor obținute. Astfel, s-a demonstrat posibilitatea obținerii de xilanază liberă de celulaze prin controlul compoziției mediului fermentativ.
- În condiții biotehnologice controlate, tulpina selecționată *Streptomyces* spp. P12-137 sintetizează un complex de enzime xilanazice, cu proprietăți catalitice particulare, dintre care două fracțiuni sunt evidente și pot fi separate prin precipitare cu sulfat de amoniu la saturații de 65% și 80%.
- Pentru aplicații practice este eficientă utilizarea preparatului enzimatic brut cu activitate complexă, care prezintă o putere hidrolitică superioară a xilanului cu aplicații practice deosebite în bioconversia substraturilor naturale hemicelulozice în produse cu valoare economică și pentru creșterea calității vieții.

Cercetările realizate și rezultatele obținute relevă o serie de elemente originale ale tezei de doctorat cu impact științific și aplicativ, după cum urmează:

- Studiile au abordat în premieră în România posibilitatea utilizării streptomicetelor ca surse importante de enzime comerciale pentru bioconversia compușilor hemicelulozici.
- S-au studiat și eficientizat etapele de izolare și selecție a tulpinilor de streptomicete activ producătoare de hemicelulaze prin aplicarea unor tehnici moderne de selecție calitativă bazată pe utilizarea substraturilor cromogene insolubile pe bază de AZCL (engl. *azurine cross-linked*).
- S-au identificat prin modelare matematică condițiile fermentative în care este posibilă obținerea, în condiții naturale, a preparatelor xilanazice libere de celulaze. Acest aspect prezintă o importanță deosebită facilitând controlul biosintezei de xilanaze libere de celulaze și creșterea eficienței economice prin reducerea etapelor de purificare.

- S-a demonstrat complexitatea funcțională a xilanazelor sintetizate de streptomicete și posibilitatea coordonării activității catalitice în procese dirijate de biotransformare a xilanilor în sisteme model și sisteme alimentare.

Aceste studii deschid noi perspective de continuare a cercetărilor care vizează utilizarea preparatului xilanazic sintetizat de tulpina selecționată *Streptomyces* spp. P12-137 pentru modificarea structurală a xilanilor în vederea obținerii de xilo-oligosaccharidelor cu rol de protecție, cu impact deosebit pentru sănătatea populației și creșterea calității vieții.

## REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Adams, E.L. (2001) *Developing molecular probes in arabinoxylan structural analysis using atomic force microscopy*. PhD thesis, University of East Anglia, Norwich, UK.
2. Ai, Z., Jiang, Z., Li, L., Deng, W., Kusakabe, I., Li, H. (2005) Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xyl-oligosaccharide production. *Process Biochem.*, 40:2707-2714.
3. Badhan, A.K., Chadha, B.S., Kaur, J., Saini, H.S., Bhat, M.K. (2007) Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* spp. IMI 387099. *Bioresour. Technol.*, 98:504-510.
4. Bahrim, G. (1998) Cercetări privind obținerea glucozimerazei cu aplicații în industria alimentară, Teza de doctorat, Universitatea din Galați.
5. Bahrim, G., Nicolau, A. (2002) *Biotehnologia preparatelor enzimatice*, Editura Academica, Galați, pp 17-19.
6. Bakir, U., Yavascaoglu, S., Guvenc, F., Ersayin, A. (2001) An endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. *Enzyme Microb Technol.*, 29:328-34.
7. Bentley, R., Meganathan, R. (1981) Geosmin and methylisoborneol biosynthesis in *Streptomyces*, *FEBS Letters*, March, Vol.125, 2, 220-222.
8. Bhat, M.K. (2000) Cellulase and related enzymes in biotechnology, *Biotechnology Advances*. 18, 355 - 383.
9. Bin, M.A., Franco, T.T. (2000) Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching. *J Chromatogr B.*, 743:349-56.
10. Bissoon, S., Christov, L. and Singh, S. (2002) Bleach boosting effects of purified xylanase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp. *Process Biochem.*, 37:567-572.
11. Buchert, J., Tenkanen, M., Kantelinen, A., Viikari, L. (1994) Application of xylanases in the pulp and paper industry. *Bioresour. Technol.*, 50:65-72.
12. Chan, A.Y., Chan, M.M., Lo, H.M., Leung, Y.C., Lim, B.I. (2002) A dual protein expression system in *Bacillus subtilis*. *Protein Expr. Purif.*, 26:337-42.
13. Cheng, H.L., Wang, P.M., Chen, Y.C., Yang, S.S., Chen, Y.C. (2008) Cloning characterization and phylogenetic relationship-encoding gene from *Streptomyces thermotrophicans* NTU-88, *Bioresour. Technol.*, 99: 227-231.
14. Cherry, J.R., Fidantsef, A.L. (2003) Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curs.Opin.Biotechnol.*, 14:438-443.
15. Chivero, E.T., Mutukumira, A.N., Zvauya, R. (2001) Partial purification and characterization of a xylanase enzyme produced by a micro-organism isolated from selected indigenous fruits of Zimbabwe. *Food Chem.*, 72:179-85.

16. Choi, I.D., Kim, H.Y., Choi, Y.J. (2000) Gene cloning and characterization of  $\alpha$ -glucuronidase of *Bacillus stearothermophilus* No.263. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64:2530-2537.
17. Cleemput, G., Hessing, M., Oort, V.M., Deconynck, M., Delcour, J.A. (1997) Purification and characterization of  $\beta$ -D-xylosidase and an endo-xylanase from wheat flour. *Plant Physiol.*, 113:377-385.
18. Cohan, F.M. (2006). Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology and evolution. *Phil. Trans.R.Soc.*, 361:1985-1996.
19. Coughlan, M.P. (1992) Xylans and xylanases, in: Visser J., Beldman, G., Vorogen, A.G.J. editors, *Progress in Biotechnology* vol.7, Amsterdam, p.113 - 139.
20. Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Morosoli, R., Shareck, F., Kluepfel, D., Derewenda, Z.S. (1994) Crystal structure, at 2,6 Å resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of  $\beta$ -1,4-D-glycanases. *J.Biol. Chem.*, 269:20811-20814.
21. Dupond, C., Roberge, M., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D.(1998) Substrate-binding domains of glycanases from *Streptomyces lividans*: characterization of a new family of xylan-binding domains. *Biochem J.*, 330:41-45.
22. Ding, C.H., Jiang, Z.Q., Li, X.T., Li, L.T., Kusakabe, I. (2004) High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 20:7-10.
23. Flores, M.E., Perez, R., Huitron, C. (1997)  $\beta$ -xilosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* spp. CH-M-1035, *Lett. Appl. Microb.*, 24:410 - 416.
24. Gaboriaud, C., Bissey, V., Benchetrit, T., Mornon, J.P. (1987). Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyze amino acid sequences. *FEBS Lett.*, 224:149-155.
25. Galante, Y.M., De Conti, A., Monteverdi, R. Application of *Trichoderma* enzymes in textile industry. In: Harman, G.F., Kubicek, C.P., editors. *Trichoderma & Gliocladium—Enzymes, biological control and commercial applications* Vol. 2. London: Taylor & Francis, 1998a. pp. 311-26.
26. Garg, A.P., McCarthy, A.J., Roberts, J.C. (1996) Biobleaching effect of *Streptomyces thermoviolaceus* xylanase preparation on birchwood kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology.*, 18:261-267.
27. Georgescu, L.A. (2003) *Enzimologie Generală*, Editura Academică, Galați, pp 62-117.
28. Georis J., Giannotta F., Buyl E.D., Granier B., Frere, J.M. (2000) Purification and properties of three endo- $\beta$ -1,4-xylanases produced by *Streptomyces* spp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. *Enzyme Microb. Technol.*, 26:178-86.
29. Gilkes, N.R., Henrissat, B., Kilburn, D.G., Miller Jr, R.C., Warren, R.A.J. (1991) Domains in microbial  $\beta$ -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol Rev.*, 55:303-315.
30. Glen, L.H., Warshawsky, I., Sharp, M.L. (2001) Macromolecular Chromogenic Substrates for Measuring Proteinase Activity, *Clinical Chemistry*, 47(2):215-222.
31. Han, S.O., Yukawa, H., Inui, M., Doi, R.H. (2003) Regulation of expression of cellulosomal cellulase and hemicellulase genes in *Clostridium cellulovorans*. *J. Bacteriol.*, 185:6067-6075.
32. Hapwood, A.D. (2007) *Streptomyces* in Nature and Medicine , Oxford University Press, Inc 198 Madison Avenue, New York, New York 10016;
33. Hazlewood, G. P. and Gilbert, H. J., (1993) Molecular biology of hemicellulases, *Hemicelluloses and Hemicellulases*, Coughlan, M. P. și Hazlewood, G. P. Eds., Portland Press, London, 103.



34. Hech, J.X. Flores, S.H., Hertz, P.F. Ayub, MAZ (2005) Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid state cultivation, *Process Biochem.*, 40:107-112.
35. Henrissat, B., Bairoch, A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J.*, 316:695-696.
36. Huang, Y., Li, W., Warg, L., Lanoot, B., Vancanneyt, M., Rodriguez, C., Liu, Z., Swings, J., Goodfellow, M. (2004) *Streptomyces glauciniger* spp.nov., a novel mesophilic streptomycete isolated from soil in south China, *Internat. J. System. and Evolutionary Microb.*, 54: 2085 - 2089.
37. Jeffries, T.(1996) Biochemistry and genetics of microbilia xylanases. *Current.Opin.Biotechnol.*, 7:337-342.
38. Jens, N, Villadsen, J., Gunnar, L. (2003) *Bioreaction engineering principles*, Second Edition, Kluwer Academic Plenum Publisher, New York.
39. Jiang, Z.Q., Deng, W., Li, X.L., Ai, Z.L., Li, L.T., Kusakabe, I. (2005) Characterization of a novel, ultra-large xylanolytic complex (xylanosome) from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *Enzyme Microb. Technol.*, 36:923-929.
40. Jin, M.A., Kim, Y.K., Lim, W.J., Hong, S.Y., An, C.L., Shin, E.C., Cho, K.M., Choi, B.R., Kang, J.M., Lee, S.M., Kim, H., Yun, H.D. (2005) Evaluation of a novel bifunctional xylanase-cellulase constructed by gene fusion, *Enzyme Microb. Technol.*, 36: 989-995.
41. Jorgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C. (2007) Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities, *Biofuel, Bioproducts, Biorefining*. [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com) accesat 27.09.2008.
42. Jurcoane, S. et al.(2004) *Tratat de biotehnologie*, Vol.1, Editura Tehnică, București.
43. Kapoor, M., Kuhad, R.C. (2007) Immobilization of xylanase from *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in production of xylo-oligosaccharides. *Appl. Biochem. Biotechnol.*,142:125-138.
44. Keith F. Charter (2006) *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 361:761-768.
45. Keleman, G.H., Buttner, M.J. (1998) Initiation of aerial mycelium formation in *Streptomyces*, *Current Opinion in Microbiology.*, 1: 656 - 662.
46. Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*, Norwich, John Innes Foundation, UK.
47. Komiyama, H., Enomoto, A., Sueyoshi, Y., Nishio, T., Kato, A., Ishii, T., Shimizu, K. Structures of aldouronic acids liberated from kenaf xylan by endoxylanases from *Streptomyces* spp. (2008) *Carbohydrate Polymers*, Elsevier Ltd., [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com), accesat 12.01.2008.
48. Koukiekolo, R., Cho, H.Y., Kosugi, A., Inui, M., Yukawa, H., Doi, R.H. (2005) Degradation of corn fiber by *Clostridium cellulovorans* cellulases and hemicellulases and contribution of scaffolding protein CbpA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:3504-3511.
49. Krengel, U., Dijkstra, B.W. (1996) Three-dimensional structure of endo-1,4- $\beta$ -xylanase I from *Aspergillus niger*: Molecular Basis for its low pH optim. *J. Mol. Biol.*, 263:70-78.
50. Kuhn, S., Lompel, J., Strohl, W.R. (1987). Isolation and characterization of a temperate bacteriophage from *Streptomyces galilaeus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 12:2708-2713.
51. Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M. (1999) Molecular and biotechnological aspects of xylanase, *FEMS Microbiol Rev.*, 23:411-456.

52. La-Grange, D. C., Claeysens, M., Pretorius, I. S., Van-Zyl, W. H. (2000) Coexpression of the *Bacillus pumilus* beta-xylosidase (xynB) gene with the *Trichoderma reesei* beta-xylanase-2 (xyn2) gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54:195-200.
53. Laing, E., Mersinias, V., Smith, C.P., Hubbard, S.J. (2006) Analysis of gene expression in operons of *Streptomyces coelicolor*, *Genome Biology*, 7:R46, <http://genomebiology.com>, accesat în martie 2008.
54. Leonid, N., Ten, I.M.W.T., Kim, M.K. (2004) Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. *J. Microbiol. Methods*, 56:375-382.
55. Liu, J., Yuan, X., Zeng, G., Shi, J., Chen, S. (2006) Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viridae* in solid substrate fermentation, *Process Biochem.*, 41:2347-2351.
56. Maciel, C.H., Vandenberghe, L.P.S., Windson, C., Haminiuk, I., Fendrich, R.C., Bianca, B.E.D., Brandalize, T.Q.S., Pandley, A., Socoli, C.R. (2008) Xylanase production by *Aspergillus niger* LPB 326 in solid-state fermentation using statistical experimental designs, *Food Technol. Biotechnol.*, 46(2): 183-189.
57. Madigan, M.T., Martinko, J.M., (2000) *Brook Biology of Microorganism*, Ninth Edition, Prentice Hall Upper Saddle River.
58. Manafi, M., Kneifel, W., Bascomb, S. (1991) Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostic, *Microbiol. Reviews.*, 3(55):335-348.
59. Mănescu, S. (1989) *Microbiologie sanitară*, Editura Medicală, București.
60. Manrich, A., Komesu, A., Adriano, S.W., Tandioli, P.W., Giordano, R.L.C. (2010). Immobilization and stabilization of xylanase by multipoint covalent attachment on agarose and on chitosan supports. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, DOI 10.1007/S12010-009-8897-0.
61. Mateescu, R., Cornea, C.P., Grebenișan, I., Câmpeanu, Gh., (2002) Aplicații biotehnologice ale bacteriilor din genurile *Streptomyces* și *Bacillus*, *Progrese în Biotehnologie* Vol.1, Ed. Ars Docendi, București, p.123-162.
62. Miguez, E.M., Hardisson, C., Manzanal, M.B., (1999) Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J. Cell Biology*, 3:515 - 525.
63. Moreau, A., Shareck, F., Kluepfel, D., Morosoli, R. (1994) Alteration of the cleavage mode and the transglycosylation reaction of the xylanase A of *Streptomyces lividans* 1326 by site-directed mutagenesis of the Asn 173 residue. *Enz. J. Biochem.*, 219:261-266.
64. Moure, A.P., Gullon, H., Dominguez, H., Parajo, J.C. (2006) Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochem.*, 41:1913-1923.
65. Nicolau, A. (2006) *Microbiologie generală. Factori care influențează dezvoltarea microorganismelor*. Editura Academica, Galați.
66. Ninawe, S., Kapoor, M., Kuhad, R.C. (2008) Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresour. Technol.*, 99:1252-1258.
67. Ninawe, S., Kuhad, R.C. (2005) Use of xylan-rich cost effective agro-residues in the production of xylanase by *Streptomyces cyaneus* SN32. *J. Appl. Microbiol.*, 99:1141-1148.
68. Noe, P., Chevalier, J., Mora, F., Comtat, J. (1986) Action of xylanase on chemical pulp fibers. *J. Wood Chem. Technol.*, 6:167-70.

69. Ohta, K., Moriyama, S., Tanaka, H., Shige, T., Akimoto, H. (2001) Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* and sequence analysis of the encoding gene. *J Biosci Bioeng.*, 92:262-70.
70. Pereira, P.S. Mesquita, A., Duarte, C.J., Barros, M.R.A., Ferreira, M.C. (2002) Rapid production of thermostable cellulase-free xylanase by a strain of *Bacillus subtilis* and its properties. *Enzyme and Microbial. Technol.*, 30: 924-933.
71. Polezeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Smith, D.S. (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Minireview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67:577-591.
72. Poorna, C.A., Prema, P. (2007) Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. *Bioresour. Technol.*, 98: 485-490.
73. Poutanen, K. (1988) *Characterisation of xylanolytic enzymes for potential applications*. Ph.D. Thesis, Technical Research Centre of Finland, Publications, 47, Espoo.
74. Pridham, G.T, Lyons, A.J. (1971) *Streptomyces torulosus* spp., an Unusual Knobby-Spored Taxon. *Appl. Microbiol.*, 22:190-193.
75. Puls, J. (1997), Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromol. Symp.*, 120:183-187.
76. Raicu et al. (1990) *Biotehnologii moderne*, Editura Tehnică, București, pp 155-200.
77. Ratto, M., Poutaner, K., Viikari, L. (1992) Production of xylanolytic enzymes by an alkaltolerant *Bacillus circulans* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37:470-473.
78. Raweesri, P., Riangrungrajana, P., Pinphanichakarn, M. (2008)  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces* spp. PC22, purification, characterization and its synergistic action with xylanolytic enzymes in the degradation of xylan and agricultural residues. *Bioresour. Technol.*, 99:8981-8986.
79. Remond, C., Boukari, I., Chambat, G., Donohue, O.M. (2008) Action of a GH 51  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase on wheat-derived arabinoxylans and arabino-xylooligosaccharides, *Carbohydrate Polymers.*, 72:424-430.
80. Rifaat, H.M., Nagieb, Z.A., Ahmed, Y.M. (2005) Production of xylanases by *Streptomyces* species and their bleaching effect on rice straw pulp, *Appl. Ecology Environm. Research.*, 4:151-160.
81. Robinson, R.K. (2000) *Encyclopedia of Food Microbiology*, Academic Press, London.
82. Rose, J.K.C. (2003) *The plant cell wall*. Blackwell Publishing Ltd., UK.
83. Ruanglek, V., Sriprang, R., Ratanaphan, N., Tirawongsaroj, P., Chantasigh, D., Tanapongpipat, S., Pootanakin, K., Eurwilaichitr, L. (2006) Cloning expression characterization and high cell density production of recombinant endo 1,4  $\beta$ -xylanases from *Aspergillus niger* in *Pichias pastoris*. *Enz. Microb. Technol.*, 12:169-176.
84. Sahn, H. (1993) *Biotechnology Vol.1 Biological Fundamentals*, VCH, Ltd.&Wellington Court, Cambridge, UK.
85. Sapag, A., Wouters, J., Lambert, C., Ioannes, P., Eyzaguirre, J. and Depiereux, E. (2002) The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships, *J. Biotechnol.*, (in press).
86. Sa-Pereira, P., Paveia, H., Costa-Ferreira, M., Barros-aies, R. (2003) A new look at xylanases: an overview of purification strategies. *Mol. Biotechnol.*, 24:257-281.
87. Senthilkumar, S.R., Ashokkumar, B., Chandra, R., Gunasekoran, P. (2005) Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn1 in

- solid-state fermentation using central composite rotary design. *Bioresour. Technol.*, 96:1380-1386.
88. Smith, E.J. (2004). *Biotechnology*, Fourth Edition, Cambridge University Pres, UK, p.52-75.
  89. Stephanopoulos, G., Rehm, H.J., Reed, G., Puhler, A., Stadler, P.(1993) *Biotechnology*, Vol.3, *Bioprocessing*, Second Edition, VCH Verlagsgesellschaft mbH D-69451, Weinheim, Germany.
  90. Subramanian, S. and Prema, P. (2002) *Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. Critical Reviews in Biotechnology.*, 22(1):33-46.
  91. Sulabha, S., Keskar, S., Rao, M.B., Deshpande, V.V. (1992) Characterization and sequencing of an active-site cysteine-containing peptide from the xylanase of a thermotolerant *Streptomyces*, *Biochem J.*, 281:601 - 605.
  92. Taylor, E.J., Smith, N.L., Turkenburg, J.P., D'Souza, S., Gilbert. H.J., Gideon, J. Davies, G.J. (2006) Structural insight into the ligand specificity of a thermostable family 51 arabinofuranosidase, Araf51, from *Clostridium thermocellum*. *Biochem. J.*, 395:31-37.
  93. Techapun, C., Charoenrat, T., Poosaran, N., Watanabe, M., Sasaki, K. (2002) Thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase produced by thermotolerant *Streptomyces* spp. Ab 106. *J. Biosci. Bioeng.*, 93(4): 431-433.
  94. Techapun, C., Charoenrat, T., Poosaran, N., Watanabe, M., Sasaki, K. (2002) Optimization of thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase production from agricultural waste by thermotolerant *Streptomyces* spp. Ab 106 using the central composite experimental design, *Biochem. Eng. J.*, 12:99-105.
  95. Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M., Sasaki, K. (2003) Optimization of aeration and agitation rates to improve cellulase-free xylanase production by thermotolerant *Streptomyces* spp. Ab106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste. *J. Biosci. Bioeng.*, 3:298-301.
  96. Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M., Sasaki, K. (2003) Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *Process Biochem.*, 38:1327-1340.
  97. Tolbot, N., J., (2003) Aerial morphogenesis: enter the dispatch chaplins, *Current Biology*, vol.13, Elsevier Science Ltd;
  98. Tseng, M.J., Yap, M.N., Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L., Chen, S.T. (2002) Purification and characterization of two cellulase free xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 30:590-595.
  99. Tsujiso, H., Miyamoto, K., Kuda, T., Minami, K., Sakamoto, T., Hasegawa, T., Inamon, Y. (1992) Purification properties and partial amino acid sequences of thermostable xylanases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl. Environ. Microb.*, 58(1): 371-375.
  100. Tuncer, M., Kuru, A., Isikli, M., Sahin, N., Celenk, F.G. (2004) Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces* spp. F2621 isolated in Turkey. *J. Appl. Microbiol.*, 97:783 - 791.
  101. Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Sundquist, J., Linko, M. (1986) Bleaching with enzymes. *Biotechnology in the pulp and paper industry. Intern. Conf. Stockholm*, 67-86.
  102. Wang, S.L., Yen, Y.H., Shih, I.L., Chang, A.C., Chang, W.T., Wu, W.C., Chai, Y.D. (2003) Production of xylanase from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme Microb Technol.*, 33:917-925.

103. Wendisch, F.K.; Kutzner, H.J. (1992) The Family *Streptomycetaceae* in: Balows, A.; Truper, H.G.; Dworkin, M. Harder, W.
104. Whister, R.L., Richards, E.L., (1970) In: Pigman W, Horton D, editors. *The carbohydrate chemistry an biochemistry*, 9th ed. New York Academic Press, p.469-477.
105. Whitaker, J.R., Alphons, G.J., Voragen, D., Wong, W.S. (2003) *Handbook of Food Enzymology*. Marcel Dekker Inc., New York.
106. Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J., Wong, D.W.S., Biely, P. (2003) *Handbook of Food Enzymology: Xylanolytic Enzymes*, Marcel Dekker Inc., New York.
107. Williams, S.T. et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1994) Editura Willims & Wilkins Company.
108. Williams, S.T. et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2003) Editura Willims & Wilkins Company.
109. Williams, S.T., Vichers, J.F. (1989). Detection of actinomycetes in the natural environmental problems and perspectives. *Symposion on Biology of Actinomycetes*.
110. Williamson, M.P., Simpson, P.J., Bolam, D.N., Hazlewood, G.P., Ciruela, A., Cooper, A., Gilbert, H.J., (1999) How the N-terminal xylan-binding domain from *C. fimi* xylanase D recognizes xylan. In: HJ Gilbert, GJ Davies, B Henrissat, S Svensson, eds. *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering.*, Cambridge: Royal Society of Chemistry, pp 3-12.
111. Wittmann S, Shareck, F., Kluepfel, D., Morosoli, R. (1994) Purificatin and characterization of the CelB Endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and sequence of the encoding gene. *Appl. Environm. Microb.*, (60) 5:1701-1703.
112. Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N. (1988) Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications, *Microbiol. Rev.*, 52:305-310.
113. Wong, S.J., Cheng, H.M., Lin, Y.S., Hung, C.H., Chen, C.W., (1999) *Streptomyces* genomes: circular genetic maps from the linear chromosomes. *Microbiology.*, 145:2209-2220.
114. Yan, Q, Hao, S., Jiang, Z., Zhai, Q., Chen, W. (2008) Properties of a xylanase from *Streptomyces matensis* being suitable for xylooligosaccharides production. *J. Molec. Catalysis.*, B: Enzymatic doi:10.1016/j.molcatb.2008.11.010.
115. Yang, C.H., Yang, S.F., Liu, W.H. (2007) Production of xylooligosaccharides from xylans by extracellular xylanases from *Thermobida fusca*. *J. Agri. Food Chem.*, 55:3955-3959.
116. Yu, E.K.C., Tan, L.U.L., Chan, M.K.H., Deschateles, L., Saddler, J.N.(1987) Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 9:16-24.
117. Zarnea, G. et. al. (1983) *Tratat de microbiologie generală*, Vol.1. Editura Academiei, București.
118. Zarnea, G. et. al. (1994) *Tratat de microbiologie generală*, Vol.5. Editura Academiei, București.
119. Zhang, G.M., Huang, J., Huang, G.R., Ma, L.X., Zhang, X.E. (2007) Molecular cloning and expression of a new xylanase gene from *Plectosphaerella cucumerina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74:339-346.
120. Zhilu, A., Zhengquiang, J., Lite, L., Wei, D., Kusakabe, I., Huisheng, L. (2005) Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylooligosaccharide production. *Process Biochem.*, 40:2707-2714.
121. [www.dimnutritionalproducts.com](http://www.dimnutritionalproducts.com) accesat in 26.09.2010.
122. [www.dyadic.com](http://www.dyadic.com) accesat in 27.09.2010.
123. [www.wishartbiology.ualberta.ca](http://www.wishartbiology.ualberta.ca) accesat in 26.01.2009

#### D. DISEMINAREA REZULTATELOR CERCETĂRIILOR

Rezultatele cercetării s-au materializat prin publicarea a 6 lucrări științifice, dintre care 4 publicate sau în curs de publicare în reviste cotate ISI și 2 în reviste din categoria B+, CNCIS indexate în baze de date internaționale.

##### A. Articole cotate ISI

1. Coman, G., Cotârleț M., Bahrim, G., Stougaard, P. (2008) - Increasing the efficiency of screening *Streptomyces* able to produce glucanases by using insoluble chromogenic substrates, *Romanian Biotechnological Letters*, vol.13, 6:20-25, ISSN 1224-5984.
2. Coman, G., Bahrim, G., (2011) Optimization of xylanase production by *Streptomyces* spp. P12-137 using response surface methodology and central composite design. *Ann. Microbiol.* DOI 10.1007/s13213-010-0195-0 (Springer) ISSN 1869-2044, ISI impact factor: 0.358(2009)
3. Coman, G., Bahrim, G. Minimise the cellulase biosynthesis from cellulase-free xylanase co-production with *Streptomyces* spp. P12-137 using optimization by response surface methodology (în recenzie la *Cellulose Chemistry and Technology*)
4. Leuștean, I., Coman, G., Bahrim, G. Optimization of the bioconversion process for bioethanol production from three cellulosic materials waste mixture (în recenzie la *Environmental Engineering and Management Journal*).

##### B. Articole din categoria B+

1. Coman, G., Radvan, M. (2009) Preliminary studies on the behavior of *Streptomyces* selected strains for xylanases production at preservation by lyophilization *Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry SCSCC6*, Vol.X, No.4,359-364 ISSN1584 - 540X Alma Mater Publishing House, University of Bacau.
2. Coman, G., Constantin, A., Enache, G., Georgescu, L., Bahrim, G. (2011) Optimization of biosynthesis conditions and catalytic behavior evaluation of cellulase-free xylanase produced by a new *Streptomyces* spp. strain. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI FOOD TECHNOLOGY*, 35(1):44-50, ISSN 2068-259X.
3. Leuștean I., Coman G., Bahrim G., (2010), The Plaket-Burman model - an improved alternative to identify the significant factors implied in the bioconversion of the complex cellulosic waste to ethanol, *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 7, 55-60, ISSN 1843-6099.



265831