



EXPLOATAREA POTENȚIALULUI MICROORGANISMELOR POLARE ÎN BIOPRODUCEREA DE ENZIME ACTIVE LA TEMPERATURI SCĂZUTE



PROMOTORII VIETII

OBTINEREA SI
DIVERSIFICAREA
RESURSELOR
NATURALE

SANATATE
CALITATEA VIETII

IMPACT SOCIO-
ECONOMIC

PROTECTIA
MEDIULUI
INCONJURATOR

OBTINEREA DE
ENERGIE

CERCETARE-DEZVOLTARE-INOVARE



PROGRES

S
U
R
S
E

de

E
N
Z
I
M
E

ORGANISMELE VII

Celule si tesuturi

Vegetale

Animale

Microorganisme

Diversitate taxonomica, morfologica si fiziologica.

Capacitate genetica de sintetiza o multitudine de enzime constitutive si adaptative.

Adaptabilitate si functionalitate in conditii fizico-chimice diverse.

Potential de supersinteza a enzimelor .

Timp de generatie redus.

Posibilitate de cultivare si control cinetic *in vitro* , la nivel industrial

Etape initiale

1833 Amilaze din malt (Franta, Anselme Payen si Jean-Francois Persoz)

1835 Enzimele biocatalizatori (Suedia, chimistul Jons Jacob Berzelius)

1836 Pepsina (Germania, Theodor Schwann)

dupa 1870 Chimistul danez Christian Hansen obtine in stare pura proteaze cu actiune coagulanta extrase din mucoasa stomacelor de vitei (rennet)

1877 Wilhelm Kuhne propune termenul de **enzima**

1897 Hans and Eduard Buchner demonstreaza ca enzimele prezente in extractele drojdie (libere de celule) sunt implicate in fermentatia alcoolica

Faza de dezvoltare rapida

Anii 1960-1970 *Era de aur a microbiologiei industriale*

Doua evenimente majore in progresul producerii si utilizarii industriale a enzimelor:

- producerea si comercializarea glucoamilazei – bioconversia amidonului;
- utilizarea enzimelor in formulele pentru detergenti.

Dupa 1980 *Biotehnologia moderna*

Progresele stiintifice in **biochimie, biologie moleculara si celulara, inginerie metabolica si genomica** au permis elucidarea multor necunoscute privind:

- biosinteza, structura si functionalitatea enzimelor ;
- au accelerat succesul obtinerii si utilizarii enzimelor

Productia si vanzarile de enzime in anul 2000 – 2 miliarde dolari

- 45% industria alimentara – 11% industria amidonului
- 34% industria detergentilor
- 11% industria textila
- 3% industria pielariei
- 1,2% industria celulozei si hartiei
- terapeutica si diagnostic



- Extinderea domeniilor de utilizare
- Eficientizarea metodelor de productie a enzimelor
- Elucidarea si optimizarea mecanismelor de biosinteza
- Extinderea functionalitatii enzimelor in medii neconventionale (presiuni ridicate, medii cu solvent, la temperaturi si pH-uri extreme)
- Proiectarea de enzime complet noi – enzime artificiale

Extinderea continua a utilizarii enzimelor a condus la necesitatea de a produce enzime cu proprietati imbunatatite

Solutii:

Descoperirea de noi surse de enzime.

Diversitatea lumii vii – microorganismele extremofile

Secventierea a peste 100 de genomuri.

Elucidarea si controlul mecanismelor de biosinteza.

Disponibilitate
Productivitate
Stabilitate

Cercetari avansate in genomica, metabolomica, proteomica.

Cercetari interdisciplinare – bioinformatica, modelare moleculara.

EXTREMOPHILE

Microbiota mediilor extreme



Microorganismele psihrofile nu pot crește la temperaturi peste 20°C, topt = 15°C

Microorganismele psihrotrofe sau psihrotolerante pot crește la 0°C, topt = peste 20°C

Pseudoalteromonas haloplanktis
Colwellia psychrerythraea
Methanogenium frigidum
Methanococcoides burtonii
Halorubrum lacusprofundii

Mecanisme de adaptare:

Sinteza unor molecule proteice specializate, care reglează fluiditatea membranelor (proteine antișoc hipotermic, sau proteine crioprotectoare, engl. *antifreeze proteins*);

Polimerizarea microtubulilor;

Reglarea permeabilității canalelor ionice;

Latența sezonieră (hibernarea),

Modificarea cineticii enzimatică



Microorganismele psihrofile–surse de enzime:

- Genom usor de secventiat
- Pot fi modificate genetic
- Au timp de generatie scazut
- Sintetizeaza enzime in cantitati mari
- Pot fi cultivate facil in conditii controlate

Enzimele adaptate la frig sunt caracterizate de flexibilitate catalitica si structurală mărită în detrimentul unei stabilității conformaționale reduse.

Demonstreaza o relație de inversă proporționalitate între stabilitate și activitate.

Unii autori consideră că instabilitatea enzimelor psihrofile poate fi pusă pe seama unei evoluții genetice incomplete.

Enzimele produse de microorganismele psihrofile contin un numar mai mare de resturi de glicină (→mobilitate), un număr redus de resturi de prolină (→flexibilitatea unităților de structură secundară), un conținut mai mic de resturi de arginină, număr mai mic de legături ce stabilizează conformația (legături de hirogen, punți ionice, interacțiuni hidrofobice, interacțiuni ion-dipol).

Aplicatii – Cataliza reactiilor biochimice la temperaturi scazute

- Producerea si conservarea alimentelor
- Biocataliza unor procese industriale in conditii avantajoase economic; functionalitatea detergentilor, bioproducerea biocombustibililor, industria textila etc.
- Bioremediere

- Beneficii economice prin reducerea consumului de energie.
- Inactivarea rapida si eficienta la nevoie.
- Reducerea riscului de contaminare.
- Minimalizarea reactiilor secundare.
- Politica europeana de mediu.

PSIHROENZIME

Microorganisme	Tip enzima	Aplicatii	Referinte
<i>Streptomyces</i> sp., <i>Streptomyces fradie</i> , <i>Alteromonas haloplanktis</i> , <i>Eisenia foetida</i>	amilaze, proteaze, celulaze și lipaze	Detergenti, industria textila, industria de panificatie, industria amidonului	Lee, 2003; Galante, 2003; Nielsen, 2005; Morita, 1997; Zhang, 2008; Zhang, 2008; Cavicchioli, 2002; Ueda, 2008
Microorganisme psihrofile	Amilaze, proteaze si xilanaze	Industria pielarie Industria de panificatie	Chessa, 1999
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Proteaze, metaloproteaze	Industria carniei Industria detergentilor, biologie moleculara	Cavicchioli, 2002
<i>Actinomyces</i> sp.	Proteaze	Biochimie	
<i>Bacillus subtilis</i>	Proteaza	Industria branzeturilor	Herbert, 1986
<i>Arthrobacter</i> sp. <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	β-galactozidaza	Industria laptelui Solventi organici	Coker, 2003 Makowski, 2009
	Catalaza	Industria prodeselor lactate si obtinerea prafului din oua	
<i>Aspergillus nidulans</i>	Lipaze	Aditivi alimentari, detergenti, industria cosmetica	Cavicchioli, 2002
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>Cenarchaeum symbiosum</i>	ARN-polimeraza ADN-polimeraza	Biologie moleculara	Cavicchioli, 2002
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85	Celulaza	Industria furajera, detergenti, industria textila	Cavicchioli, 2002

PSIHROENZIME


Microorganismele	Tip enzima	Aplicatii	Referinte
Microorganismele psihrofile	Amilaze și glucoamilaze	Bioetanol	Margesin, 2008
<i>Colwellia maris</i>	Enzime active la temperaturi scăzute Malat sintetaza Izocitrat liaza	Conversia biomasei, producere de metan, epurarea apelor reziduale, bioremedierea în zone reci	Brenchley, 1996; Cavicchioli, 2002
<i>Sclerotinia borealis</i>	Pectinaze	Industria sucrurilor, industria vinului	Cavicchioli, 2002
<i>Vibrio rumoiensis</i>	catalaza	Tratarea apelor reziduale	Cavicchioli, 2002
<i>Vibrio</i> strain 2693	Transferaze	Bioremediere	Cavicchioli, 2002

Biotopul Antarctica reprezintă un mediu natural unic, bogat în specii adaptate la condiții extreme.

Biota Antarctica oferă noi perspective dezvoltării *Biotehnologiei moderne*, prin studii avansate în genomica, metabolomica și proteomica, menite să elucideze mecanismele funcționării și supraviețuirii organismelor vii la temperaturi scăzute.



BIODIVERSITATEA ECOSISTEMELOR POLARE



Multe grupuri de organisme au dispărut în Antarctica, ca urmare a condițiilor climatice extreme, dar și ca urmare a poluării și intensificării activităților umane



Anual Antarctica este colonizata de:

- 5000 de cercetatori_bazele de cercetare ale Tratatului Antarctic
- 30000 de turisti (transport aerian sau maritim)
- Pasari migratoare



Poluarea aeriana, terestra
Schimbarile climatice



Studiul potentialului biotehologic al microorganismelor izolate din regiunile polare



Statiya "Law – Racovita"
(Australia – Romania)



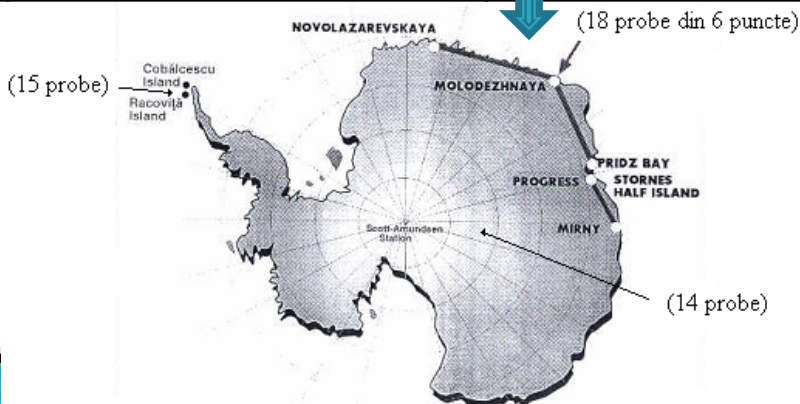
FOTO: TEODOR NEGOCIȚĂ



Studiul potentialului enzimatic al microorganismelor polare

Probe biologice din Antarctica	Zone de recoltare a probelor biologice	Microorganisme izolate
Sol	<ul style="list-style-type: none"> •LARSERMANN HILLS •PROGRESS STATION •DRUJNAYA BASE •MIRNY STATION •HASWELL ARCHIPELAGO 	Bacterii Fungi
Vegetatie	<ul style="list-style-type: none"> •LAW BASE •PENINSULA STORNES •INSULA KING GEORGE •MUNTII GROVE 	

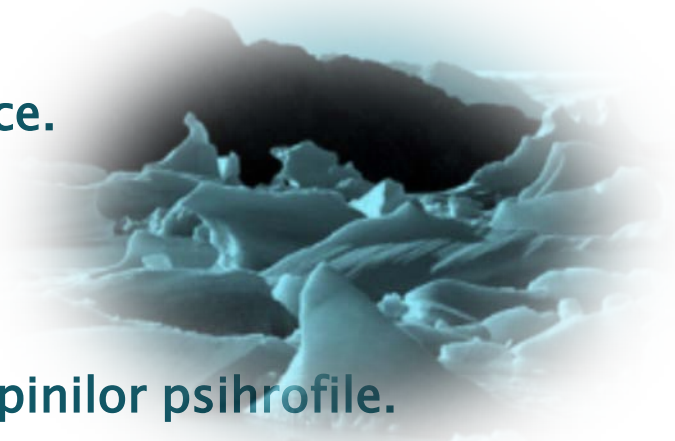
Bacterii activ producatoare de enzime	Enzime cu importanta economica
<i>Bacillus</i> sp.	Amilaze Proteaze
<i>Streptomyces</i> sp.	Amilaze Proteaze Fenoloxidaze (tirozinaza, lacaza) Celulaze Xilanaze Transglutaminaza
<i>Pseudomonas</i> sp.	Lipaze



Studiul potentialului enzimatic al microorganismelor polare

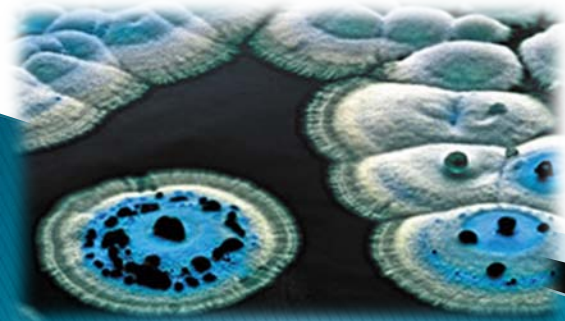
► Obiective:

- ❑ Recoltarea si conservarea probelor biologice.
- ❑ Izolarea si conservarea culturilor pure.
- ❑ Selectia tulpinilor psihrofile.
- ❑ Caracterizarea genetica si biochimica a tulpinilor psihrofile.
- ❑ Optimizarea conditiilor biotehnologice de productie a enzimelor active la temperaturi scazute (5...20C).
- ❑ Purificarea si caracterizarea proprietatilor catalitice ale enzimelor active la temperaturi scazute.
- ❑ Studiul stabilitatii enzimelor cold active.
- ❑ Conservarea potentialului catalitic prin imobilizarea enzimelor si a celulelor active enzimatic.



Teze de doctorat in derulare

- ▶ *Evaluarea potențialului bacteriilor din biotopuri polare privind obținerea de amilaze și proteaze, adaptate la temperaturi scăzute*
Streptomyces griseus – sol Antactica
- ▶ *Obținerea și caracterizarea unei lipaze bacteriene active la temperaturi scăzute*
Pseudomonas fluorescens – sol Varful Omu



Lucrari publicate

- ▶ Bahrim, G., Iancu, C., Butu, N., Negoită, T., 2010, Production of a novel microbial transglutaminase using *Streptomyces sp.* polar strains. *Romanian Biotechnological Letters* Vol. 15, No.2, pp.5197–5203, ISSN 1224–5984
- ▶ Leonov, S., 2010, Screening for novel cold-active lipases from wild type bacteria isolates. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 6, p. 7–12
- ▶ Cotarlet, M., Negoita, T., Bahrim, G., Stougaard, P., 2009, Cold adapted amylase and protease from new *Streptomyces* 4 Alga antarctic strain. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 5, p. 23–30
- ▶ Iancu C., Butu N., Bahrim G., 2009, Preliminary studies regarding transglutaminase synthesis by polar filamentous bacteria of the genus *Streptomyces sp.* *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 4 , p. 2–15
- ▶ Mihaela Cotarlet, Teodor Negoită, Gabriela Bahrim, Peter Stougaard, 2008, Cold-adaptation and alkaline hydrolytic properties of the polar streptomycetes prediction on plate assay, based on insoluble chromogenic substrates with azurine cross-linked, *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI – Food Technology*, New Series, Year I (XXXI), p. 17–22
- ▶ Mihaela Cotarlet, Teodor Negoită, Gabriela Bahrim, Peter Stougaard, 2008, Screening of polar streptomycetes able to produce cold-active hydrolytic enzymes using common and chromogenic substrates, *Romanian Biotechnological Letters, Special issue edited for International Conference on Industrial Microbiology and Applied Biotechnology*, vol. 13, no 5, supplement, p. 69–80

Lucrari publicate

- ▶ Bahrim G, Scintee M., Negoita T, 2007, Biotechnological conditions of amylase and protease complex production and utilisation involving filamentous bacteria, *The Annals of the University Dunarea de Jos Galati, Fascicle IV–Food Technology, New Series, Year I (XXX)*, p.76–82
- ▶ Gabriela Bahrim, Teodor Negoită, 2004, *Effect of inorganic nitrogen and phosphorous sources on hydrolase complex production by a selected Bacillus subtilis polar strain.* Roumanian Biotechnological Letters, vol.9, nr.6, pp. 1925–1932, ISSN: 1224–5984
- ▶ Gabriela Bahrim, Teodor Gheorghe NEGOIȚĂ, 2001, Study of tyrosinase biosynthesis potential of some *Streptomyces* sp. strain isolated from Antartica soils. *The Annals of „Dunărea de Jos” Galați University, fascile VI, Food Technology*, p.33–40

Lucrari prezentate la conferinte

- ▶ S.L. Leonov, L. van der Broek, J. Springer, G. Bahrim, C.G. Boeriu; 2010, Purification and characterization of an extracellular cold-active lipase from a soil isolate identified as *Pseudomonas fluorescens*. Conferinta NBC-13, 11-12 martie 2010, Ede, Olanda
- ▶ Bahrim, G., Negoita, T. Gh., Cotarlet, M. 2008. *Antarctic soils, resources of microorganisms with biotechnological properties*. European Geosciences Union Conference, SSS24 Soil microbial activity. Assessment, monitoring and modeling, Geophysical Research Abstracts, Vol. 10, EGU2008-A-11212, 2008, SRef-ID: 1607-7962, 13-18 April, Vienna, Austria
- ▶ Bahrim Gabriela, Negoita Teodor, 2007, Antarctic Soils Bacteria a Source of Enzymes as Bioremediation Agents. *CIGR Section VI International Symposium on Food and Agricultural Products: Processing and Innovations*, Naples Italy,
- ▶ Bahrim G., Negoită, T. Gh., 2007, *Streptomyces* strains from East Antarctic soils as tyrosinase producers. The VI Argentine and III Latin-American Symposium on Antarctic Research, Buenos Aires, Argentina, September 10-14 2007. *VI Argentine and III Latin-American Symposium on Antarctic Research Proceeding*, ISSN 1851-555X

Lucrari prezentate la conferinte

- ▶ Mihaela Cotarlet, Teodor Negoită, Gabriela Bahrim, 2007, Polar bacteria–enzyme sources for bioremediation. Polar Research Workshop – *The 2nd International Symposium of Polar Scientific Research* Organized by Romanian Polar Research Institute. European Science Foundation German Institute For Polar and Marine Research „Alfred Wegener”, Romanian Academy Meeting Hall, 16–17 November 2007 Bucuresti
- ▶ Bahrim G., Negoită, T. Gh., 2007, Antarctic bacteria as good producers of Industrial interest enzymes, *The VI Argentine and III Latin–American Symposium on Antarctic Research*, Buenos Aires, Argentina, September 10–14 2007. *VI Argentine and III Latin–American Symposium on Antarctic Research Proceeding*, ISSN 1851–555X
- ▶ Bahrim G, Negoita T.G, Minghong C., 2004, Preliminary screening to put into evidence the potential to produce tyrosinase of some *Streptomyces* sp. strains isolated from east antarctic soils. *XXVIII SCAR Open Science Conference*, Bremen Germany
- ▶ Gabriela Bahrim, Teodor Gheorghe Negoita, 2002, Study of tyrosinase biosynthesis potential of some *Streptomyces* sp. strains isolated from Antarctic soils. *Workshop on Changes of the Polar Ecosystem 3rd Annual Meeting of Polar Section of the Czech Geographical Society* Nove Hradý , 2–5 October Czech Republic

Proiecte derulate

- ▶ **Fundatia Europeana pentru Stiinta, programul EUROPOLAR ERA-NET, 2010-2012 -INTERHEMISPHERE** "The Structure and dynamics of polar ecosystems: Interhemispheric comparisons of micro, macroflora and biogeochemical processes in relation to climate change"
- ▶ **Framework RTD Programme 6, ERAC 5178426,2005-2008, EUROPOLAR ERA-NET**, <http://www.europolar.org/pages/1/index.htm>
- ▶ **Programul CEEEX, Modulul III, COD MEC 12500, 2006-2008, Structurarea cercetarii integrate in cooperarea europeana si internationala privind biodiversitatea ecosistemelor polare, raspunsul la modificarile mediului si aplicatii**
- ▶ **Programul CEEEX, Modulul III, COD MEC 12440, 2006-2008, Promovarea cercetării în cooperare europeana și internațională privind potențialul microorganismelor psihrofile în bioremediere**
- ▶ **Programul MENER, Proiect nr.512, 2004-2006 Cercetări în zonele polare.**

Propuneri de proiecte, 2010

- ▶ FP7–Discovery, production and evaluation of novel and robust oxydases “EUROENZYME”
- ▶ ERA– IB, DEVELOPMENT OF MULTI–PRODUCT BIOPROCESSES “MULTIPRO”

ECHIPA DE CERCETARE



Dr . NEGOITA Teodor
Institutul Roman de Cercetari
Polare



Drd. Mihaela COTARLET



Drd. Laura LEONOV



Drd. COMAN Gigi



Prof.dr.Valentina DAN
1990–2001



Prof. Gabriela BAHMIM
Facultatea de Stiinta si
ingineria alimentelor
Univeristatea "Dunarea
de Jos" Galati



Dr. Carmen BOERIU
Food & Biobased
Research, Wageningen
University, The
Netherlands



Prof. Peter STOUGAARD,
Faculty of Life Sciences,
Department of
Agriculture and
Ecology, University of
Copenhagen