

REZUMAT

al tezei de doctorat intitulată:

IMPLICAȚII BIOTEHNOLOGICE ALE UNOR OXIDO-REDUCTAZE DE ORIGINE MICROBIANĂ

Doctorand: **ALBU (PROCA) Cristina-Valentina**

Conducător științific: **Prof. Univ. Dr. CORNEA Petruța-Călina**

CUVINTE-CHEIE: *Trichoderma*, laccază, lignin peroxidază, mangan peroxidază, antitumoral, clarificare sucuri

Oxidoreductazele reprezintă acea clasă de enzime ce catalizează reacțiile de oxidoreducere ce au loc în organismele vii. Laccaza aparține familiei polifenol oxidazelor și este foarte importantă pentru îndepărtarea poluanților din mediu datorită proprietăților sale structurale și funcționale. Recent, abilitatea laccazei de oxidare a substanțelor fenolice și nefenolice a fost luată în considerare de mulți cercetători. Deși fungii filamentoși produc cantități mari de laccază, producția la scară industrială încă se confruntă cu multe probleme. În prezent, cercetătorii încearcă să crească eficiența și productivitatea laccazei și să reducă prețul final al acesteia, prin găsirea de microorganisme adecvate și îmbunătățirea procesului de producție și purificare a laccazei.

Având în vedere aspectele menționate mai sus, în cadrul prezentei lucrări obiectivul principal a fost acela de a selecta microorganisme producătoare de enzime oxido-reductazice, în special laccază, de a optimiza procesul de obținere al enzimei, de a o caracteriza și de a testa diferite aplicații ale acesteia.

Partea bibliografică este structurată în trei capitole, în care sunt prezentate oxido-reductazele, ca grupă principală de enzime, cu focusare pe laccază, mangan peroxidază și lignin peroxidază, completată cu cele mai recente informații referitoare la microorganismele raportate ca fiind producătoare de oxido-reductaze/laccază, modalitățile de obținere și purificare, precum și de aplicații ale lacazelor în diferite industrii (alimentară, farmaceutică, bioremediere).

Partea experimentală a fost focalizată pe patru obiective mari, structurate în cinci capitole, completate cu unul de concluzii și perspective.

Primul capitol experimental (cap. 4), prezintă rezultatele selecției a unor tulpini de micromicete și macromicete potențial producătoare de enzime laccazice, corelat cu optimizarea metodei de screening în placă, prin adaos de guaiacol ca și inductor. Screeningul a fost realizat tulpini fungice pe aparținând genurilor *Aspergillus*, *Botrytis*, *Neurospora*, *Penicillium* și *Trichoderma*, precum și pe tulpini de macromicete aparținând speciilor *Agaricus bisporus*, *Pleurotus* sp., *Ganoderma lucidum* și *Laetiporus sulphureus*.

În urma acestei cercetări am identificat două tulpini aparținând grupului de micromicete (fungi filamentoși) ca fiind pozitive pentru producția de laccază și anume *Trichoderma* sp. MI2 și *Trichoderma* sp. CP. Ambele tulpini de *Trichoderma* spp. au prezentat activitate laccazică ridicată la concentrația de 0,025% guaiacol. O concentrație mare din soluția de guaiacol (0,1% până la 1%) poate inhiba dezvoltarea micromicetelor. S-a concluzionat faptul că atunci când se realizează screeningul în placă, se recomandă utilizarea concentrațiilor de guaiacol mai mici, începând de la 0,01% și până la 0,075%.

În urma rezultatelor obținute în acest studiu s-a concluzionat și faptul că tulpina *Pleurotus* este producătoare de enzime laccazice, tulpină ce a provenit din deșeurile unui supermarket. În urma cultivării pe mediu PDA suplimentat cu soluție de guaiacol, concentrația optimă a fost cea de 0,025% pentru tulpina

Pleurotus. Încă din primele 24 de ore tulpina a dovedit că prezintă activitate laccazică ridicată deoarece apariția haloului roșu-cărămiziu a avut loc imediat după însămânțare.

Capitolul următor (capitolul 5) prezintă celor două tulpini de *Trichoderma* selectate anterior la nivel de specie, prin tehnici de biologie moleculară. Abordarea moleculară a identificării celor două tulpini a fost aceea a amplificării fragmentelor conservate ITS1-ITS4, urmat de aplicarea tehnicii PCR-ITS-RFLP, corelat cu rezultate ale secvențierii. În urma amplificării ADN-ului bacterian cu perechea de primeri ITS1/ITS4 s-a obținut o singură bandă, a cărei dimensiune este în jur de 600 bp.

Pentru identificarea și discriminarea tulpinilor de *Trichoderma* a fost folosită combinația de trei endonucleaze (*SduI*, *HinfI* și *HhaI*). Produsele de PCR nu au clivat cu enzima de restricție *SduI*. Ambele tulpini au prezentat același profil de restricție, respectiv: în cazul utilizării enzimei de restricție *HinfI* au fost obținute 3 fragmente de restricție, iar în cazul utilizării enzimei de restricție *HhaI* au fost obținute 4 fragmente de restricție a căror dimensiune a corespuns profilului de restricție obținut teoretic pentru *Trichoderma* sp.

Tulpinile au fost identificate prin secvențierea regiunii 5,8S-ITS ca fiind *Trichoderma asperellum*, având un procent de identitate de 100% cu numeroase secvențe de *T. asperellum* existente în baza de date.

Următorul capitol (capitolul 6), unul din cele mai consistente, include o serie de teste preliminare și de optimizare a activității oxido-reductazice în condiții de laborator, pe mediu lichid, în prezența sau absența unor inductori. Au fost realizate mai multe variante experimentale. Într-o etapă preliminară, a fost testată influența pH-ului asupra activității enzimatică în prezența guaiacolului, precum și influența prezenței CuSO_4 ca și inductor. Mai apoi, s-a realizat optimizarea activității enzimatică în prezența CuSO_4 ca și inductor, urmat de optimizarea activității mangan-peroxidazei și a lignin-peroxidazei prin includerea în mediu de MnSO_4 și veratril alcool.

Testarea preliminară a evidențiat că activitatea oxido-reductazică (laccazică, lignin-peroxidazei și mangan-peroxidazei) cea mai ridicată a fost înregistrată în culturile cu un pH inițial de 8; adăugarea de guaiacol ca inductor, crește ușor activitatea enzimatică. Prezența inductorului CuSO_4 în concentrație de 1 mM în mediul M7 și respectiv de 2 mM în mediul PDB a determinat creșterea activității laccazice.

La optimizare, prezența inductorului $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ în concentrație de 1mM a determinat în cazul ambelor tulpini de *Trichoderma* obținerea unei activități a mangan peroxidazei de peste 1 U/mL după 72 de ore de incubare. Utilizarea alcoolului veratril în concentrație de 2mM a determinat în cazul ambelor tulpini de *Trichoderma* obținerea unei activități a lignin peroxidazei de peste 1 U/mL după 96 de ore de incubare.

Următoarele două capitole adresează aplicații practice ale utilizării complexelor enzimatică oxido-reductazice. Capitolul 7 prezintă studiul prin care s-a încercat testarea a două tulpini comerciale de laccază (*Trametes versicolor* și *Trametes hirsuta*) pe linia celulară HT-29, linie celulară canceroasă umană derivată din adenocarcinom colorectal cu morfologie tipică epitelială. Pentru determinarea dozei de lucru a fost evaluată viabilitatea celulelor HT-29, prin testul spectrofotometric cantitativ MTT, după 24h de expunere la tratamentul cu 11 diluții din laccazele comerciale. S-a observat că cea mai mare concentrație de enzimă (1 mg/mL) inhibă dezvoltarea celulelor tumorale în raport cu martorul, diferențele între cele două laccaze nefiind distinct semnificative. Astfel laccazele comerciale inhibă cu 25-40% viabilitatea celulelor tumorale.

Ultimul capitol experimental (capitolul 8) a avut drept scop testarea efectului laccazei asupra conținutului total de polifenoli din suc de mere pe o perioadă de depozitare în condiții de refrigerare de 7 zile, corelat cu evoluția activității antioxidante, polifenolii fiind cunoscuți pentru efectul lor antioxidant, dar și pentru că sunt principalii factori implicați în degradarea sucurilor de fructe, cauzând turbiditate, intensificare a culorii, alterări ale gustului și aromei și formarea de sedimente, afectând termenul de valabilitate al produselor și percepția consumatorilor.

În urma testelor realizate se poate observa o scădere accelerată a conținutului total de polifenoli din probele de suc de mere în care s-a utilizat laccaza, comparativ cu proba martor, care a avut o scădere mai lentă. Probele de suc de mere în care s-a utilizat laccaza comercială în diferite concentrații (LC 0,5%, LC 1% și LC 1,5%) au prezentat o reducere semnificativă a conținutului total de polifenoli, după 3 zile de depozitare acesta ajungând să fie cu 80% mai mic decât în momentul inițial.

Complexele enzimatice de laborator obținute cu *Trichoderma* TdMI2 și *Trichoderma* TdCP, în concentrație de 1,5%, după 7 zile putând fi observat un conținut de polifenoli cu 56- 61% mai mic decât în momentul inițial. Un efect negativ al utilizării laccazei în tratarea sucurilor de mere ar fi brunificarea acestora cauzată de formarea de oligomeri prin denaturarea polifenolilor, compuși care ar putea fi totuși eliminați printr-o centrifugare ulterioară.

Referitor la elementele de noutate, speciile de *Trichoderma* au fost foarte puțin studiate în raport cu obținerea de oxido-reductaze, în special de laccază. Pentru prima dată în au fost raportate tulpini de *Trichoderma asperellum* potențial producătoare de laccază. Se evidențiază faptul că aceste tulpini au fost izolate și conservate de către echipa de cercetare a Facultății de Biotehnologii din cadrul USAMV București.

La nivel de optimizare a activității enzimatice, utilizarea de inductor, precum MnSO_4 și veratril alcool nu a mai fost raportată până în prezent pentru inducerea activității oxido-reductazice (laccază, lingnin peroxidază și mangan peroxidază) la specie *Trichoderma asperellum*.

În trend cu cercetările actuale la nivel mondial, la nivel național a fost realizată prima testare a inhibiției liniilor tumorale de adenocarcinom de colon (HT29) cu ajutorul laccazei de origine microbiană, fiind obținute rezultate pozitive, încurajatoare.

În premieră, a fost raportat un complex enzimatic provenit de la *Trichoderma asperellum* cu potențial ridicat de utilizare în limpezirea sucului de mere.