ACADEMIA ROMÂNĂ

INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREŞTI

060031 Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296, C.P. 56-53, Tel. 021. 221.92.02, Fax 021. 221.90.71; e-mail: biologie@ibiol.ro

Se aprobă,

Director,

Acad. Octavian Popescu

Raport ştiinţific şi tehnic al etapei 1 – 2014 - în cadrul proiectului

Biocatalizator cooperativ-dual pentru biorafinărie – oportunităţi şi provocări pentru conversia glicerolului rezidual la produşi valoroşi în industria polimerilor

http://www.ibiol.ro/proiecte/PNII/BioGlyCat/index.htm

Parteneri implicaţi în etapa 1:

- Institutul de Biologie Bucureşti al Academiei Române – coordonator
- Universitatea Bucureşti – Facultatea de Chimie – partener 1

Sef department

Acad. Octavian Popescu

Director proiect,

dr.Mădălin Enache

Etapa 1 – Biocatalizatori – screening general

Activitatatea 1.1. – Screeningul tulpinilor de microorganisme din colectia IBB, producatoare de lipase, esteraze, decarboxilaze şi optimizarea condiţiilor de biosinteză a enzimelor – CO

Activitatea 1.2. – Studiul interacţiei microorganisme – glicerol – CO, P1

Activitatea 1.3. – Realizarea site-ului proiectului – CO

Activitatea 1.4. – Adaptarea sistemului biocatalitic la instalatia pilot – studiu teoretic – CO, P1

Activitatea 1.1. si 1.2

Proiectul BioGlyCat lansează ideea unei noi alternative tehnologice pentru producerea derivaţilor glicerolului de tipul GlyC, GlyD şi poliglicerol la nivel industrial. In acest sens se foloseşte ca materie primă glicerolul rezidual provenit în urma procesului biodiesel. Procesul de sinteză propus si care se va realiza in cadrul proiectului implică transformarea biocatalitică (biocatalizator cooperativ-dual enzimatic) a glicerolului în GlyD şi poliglocerol având ca etapă intermediară formarea GlyC. Sistemul biocatalitic construit şi optimizat în condiţii de flux continuu va fi dezvoltat la scară industrială (instalaţie pilot).

În ultimii ani, o mare atenție a fost dedicată aplicării de procese catalitice verzi pentru a converti materiile prime bioregenerabile în chimicale folositoare, dar şi combustibili ne-fosili. Glicerolul (1,2,3-propantriol sau glicerină) este un produs chimic utilizat la scară largă. El poate fi găsit în mod natural în formă de esteri ai acizilor graşi şi de asemenea, ca intermediari importanți în metabolismul organismelor vii. În formă pură, glicerolul este un lichid vâscos, dulce la gust, incolor, inodor şi complet solubil în apă. În zilele noastre, glicerolul este produs în cantităţi foarte mari, ca produs secundar, prin transesterificarea acizilor graşi în biodiesel, folosind ca materie primă biomasa. Pentru a ilustra aceast fapt, trebuie să amintim că piața glicerolului la nivel mondial a fost de 22 bilione tones in 2012, 800000 de tone în 2005, cu 400000 de tone din biodiesel, în comparație cu numai 60000 de tone în 2001 (Zhou si colab., 2008).

Folosirea glicerolului pentru sinteze de produse chimice este de mare importanță industrială, nu numai pentru că glicerol este disponibil în cantități mari în urma procesului de biodiesel, dar și pentru că glicerolul este un compus netoxic, comestibil, biodurabil, biodegradabil, proprietăţi ce au condus la conceptul general de glicerol - moleculă platform.

Atentia noastra a fost indreptata preponderent asupra glicerol carbonatului si glicidolului deoarece ambii sunt produsi de interes pentru procesul biocatalitic propus de proiectul BioGlyCat. Obţinerea de glicerol carbonat ieftin ar putea servi ca o sursă de noi materiale precum glicidolul, o componentă de mare valoare utilizată în industria farmaceutică, ca intermediar chimic în sinteza de glicidil eteri, esteri, amine și ca o componentă de mare valoare în producția de rășini glicidil carbamat și poliuretani. Glicidolul este produs comercial prin epoxidarea de alcool alilic folosind un catalizator bazic de wolfram. Dezavantajul acestui procedeu este numărul de etape implicate dar și descompunerea

catalizatorului. Există câteva brevete pentru sinteza de glicidol din glicerol carbonat folosind drept catalizator zeoliţi, însă, dezavantajul acestor metode îl reprezintă presiunile scăzute şi temperaturile ridicate necesare pentru sinteză. De asemenea, glicidolul poate fi obţinut din glicerol și carbonaţi ciclici, cum ar fi etilen carbonatul (Gade si colab., 2012), într-un proces în două etape. Reacția este efectuată sub presiune redusă într-un interval de temperatură de 140-240°C. Un alt procedeu de preparare a glicidolui din glicerol presupune utilizarea de cloruri, bromuri, acetați, carbonați sau bicarbonati de fosfați alcalini și alcalino-pamantosi, drept catalizatori, sub presiune redusă şi o temperatură de 125-275°C.

In cadrul activitatilor 1.1. si 1.2 din etapa 1 a proiectului s-a realizat un screening al tulpinilor de microorganisme din colectia IBB, producatoare de lipaze, esteraze, decarboxilaze, s-au realizat protocoalele experimentale privind optimizarea condiţiilor de biosinteză a enzimelor mentionate si s-a studiat interactia dintre microorganisme si glicerol. Enzimele de interes, lipaza si decarboxilaza, au fost obtinute in forma nepurificata urmand ca ele sa fie purificate in cadrul etapei 2 a proiectului conform activitatilor 2.1 si 2.2 din Planul de realizare a proiectului. In forma obtinuta in etapa actuala au fost trimise partenerului 1 pentru teste preliminare aferente acrivitatilor 2.3 si 2.4 din cadrul etapei 2 a proiectului. Rezultatele asteptate ale etapei 1 a proiectului conform Planului de realizare aprobat au fost astfel obtinute, toate obiectivele fiind atinse si indeplinite. Rezultatele stiintifice din cadrul experimentelor derulate in cadrul etapei 1 a proiectului urmeaza sa fie valorificate conform activitatilor 3.7, 3.8 si 3.9 din cadrul proiectului.

Sunt prezentate in continuare datele experimentale semnificative obtinute in cadrul activitatilor din aceasta etapa de realizare a proiectului.

EXPERIMENTE DERULATE CU MICROORGANISME EXTREMOFILE

Screeningul tulpinilor de microorganisme arheene extrem halofile prezente în colecția IBB producătoare de enzime extracelulare: lipaze, esteraze și decarboxilaze

Microorganisme arheene extrem halofile – În cursul acestei etape au fost realizate experimente care au vizat testarea capacităţii unor tulpini arheene extrem halofile, care aparţin colecţiei de microorganisme a IBB, de a sintetiza enzimele extracelulare de interes (menţionate mai sus). Microorganismele arheene extrem halofile au fost izolate din probe de apă prelevate din lacul hipersalin Grota Miresei (12 tulpini, notate 5/1GM – 5/12 GM) şi din cristale de sare (6 tulpini denumite 1CS/4, 1CS/5, 1 CS/6, 1CS/17, 1CS/27 şi 1CS/28), prelevate din depozitul subteran de sare de la Slănic Prahova, respectiv din Mina Unirea.

Tulpinile arheene au fost izolate în plăci Petri, utilizând mediul de cultură selectiv HS (Oren şi Litchfield, 1999), conţinând 250 g NaCl/l. Plăcile Petri cu mediul de cultură agarizat au fost incubate la temperatura de 37^0C, timp de 7 – 10 zile. Ulterior, coloniile de microorganisme halofile obţinute au fost

repicate pe tuburi cu acelaşi mediu solidificat înclinat şi apoi au fost purificate prin metoda epuizării ansei. Tulpinile de microorganisme halofile pure obţinute au fost selectate pe baza caracteristicilor morfologice coloniale diferite şi au fost testate pentru apartenenţa la domeniul *Bacteria* sau *Archaea* pe baza sensibilităţii la inhibitori specifici, de tipul cloramfenicolului sau sărurilor biliare (deoxicolatul de sodiu). Tulpinile halofile care au crescut pe mediul de cultură selectiv cu adiţie de cloramfenicol, dar au fost incapabile să se dezvolte pe acelaşi mediu de cultură cu adiţie de deoxicolat de sodiu, au fost încadrate în categoria microorganismelor arheene extrem halofile (haloarhee) şi au fost utilizate în experimentele ulterioare.

Testarea capacităţii tulpinilor haloarheene selectate de a sintetiza enzime extracelulare de tipul lipazelor şi esterazelor:

- *capacitatea tulpinilor haloarheene de a produce lipaze* – a fost evidenţiată prin cultivarea acestora pe mediul selectiv HS (cu concentraţia de 250 g NaCl/l), conţinând 0.1% yeast extract, 2.5 % ulei de măsline extravirgin şi 0.001% rodamină B. Mediul de cultură a fost turnat în plăci Petri, însămânţat cu tulpinile haloarheene aflate în fază de creştere exponenţială şi plăcile au fost apoi incubate la temperatura de 37^0 C, timp de 7 – 10 zile. După acest interval de timp, plăcile au fost vizualizate la transiluminator în lumină UV, iar apariţia unui halou colorat în roşu-portocaliu în jurul zonei de creştere a culturilor a indicat tulpinile haloarheene pozitive, producătoare de lipaze (Bhatnagar si colab., 2005; Ozcan si colab., 2009).
- *capacitatea tulpinilor haloarheene de a produce esteraze* – a fost determinată prin cultivarea acestora pe mediul de cultură selectiv HS conţinând $CaCl_2$ (0.1 g/l), yeast extract (1g/l), la care s-a adiţionat Tween 80 în concentraţie de 1 ml/l. Mediul a fost turnat în plăci Petri şi inoculat cu culturile haloarheene aflate în fază de creştere exponenţială, crescute în tuburi cu mediul HS (nemodificat) solidificat înclinat.

  Plăcile Petri conţinând mediul HS (modificat pentru testarea activităţii esterazice) inoculat cu tulpinile haloarheene, au fost incubate la de 37^0 C, timp de 7 zile. După această perioadă, tulpinile pozitive, producătoare de esteraze au format un halou clar în jurul zonei de dezvoltarea a culturilor, datorită formării laureatului de calciu. În cazul tulpinilor care au prezentat activitate slabă, rezultatele s-au interpretat după o perioadă de 15 zile de creştere la 37^0 C.

Evidentierea capacităţii tulpinilor haloarheene selectate de a produce decarboxilaze s-a realizat prin testarea dezvoltării acestora pe mediul de cultură HS lichid, conţinând glicerol provenit de la Slobozia (glicerol S) şi Medias (glicerol M), ca unică sursă de carbon şi energie. În acest scop, s-a realizat un inocul pentru fiecare tulpină haloarheană selectată, prin creşterea microorganismelor în flacoane Erlenmeyer cu mediul selectiv HS lichid, în condiţii de agitare (150 rpm), la 37^0C, timp de 72 ore. După acest interval de timp, culturile obţinute au fost centrifugate, iar sedimentul celular a fost spălat cu soluţie de NaCl 25% sterilă şi resuspensionat în aceeaşi soluţie, fiind apoi utilizat (în

raport de 1/10) ca inocul pentru iniţierea culturilor test pe mediul HS lichid, conţinând glicerol provenit de la Slobozia (glicerol S) şi Medias (glicerol M), ca unică sursă de carbon şi energie, în concentraţie de 1%. Culturile obţinute au fost incubate în condiţii de agitare (150 rpm), la 37^{0}C, timp de 28 zile. Creşterea tulpinilor în prezenta glicerolului S/M a fost determinată spectrofotometric, prin determinarea densităţii celulare la 660 nm, după 7 zile şi respectiv, 28 zile de incubare în aceleaşi condiţii de creştere, comparativ cu densitatea optică determinată la momentul inoculării (T0).

Rezultatele obţinute privind screening-ul tulpinilor arheene extrem halofile producătoare de lipaze, esteraze şi decarboxilaze au evidenţiat faptul că dintre cele 18 tulpini testate 14 tulpini au fost capabile să producă esteraze extracelulare, a căror sinteză a fost evidenţiată prin hidroliza compusului Tween 80 şi producerea laureatului de calciu. Tulpinile haloarheene izolate din proba de apă hipersalină prelevată din lacul Grota Miresei au prezentat o capacitate crescută de biosinteză a acestor enzime comparativ cu tulpinile arheene extrem halofile izolate din cristalul de sare prelevat din Mina Unirea. Astfel, dintre cele 12 tulpini izolate din lacul Grota Miresei şi testate pentru activitatea esterazică, 11 au produs enzimele extracelulare (tabelul nr. 1, 2, fig. 1). Comparativ, dintre cele 6 tulpini izolate din cristal de sare, doar 3 tulpini au prezentat capacitate de biosinteză a esterazelor (tabelul nr. 1, 2).

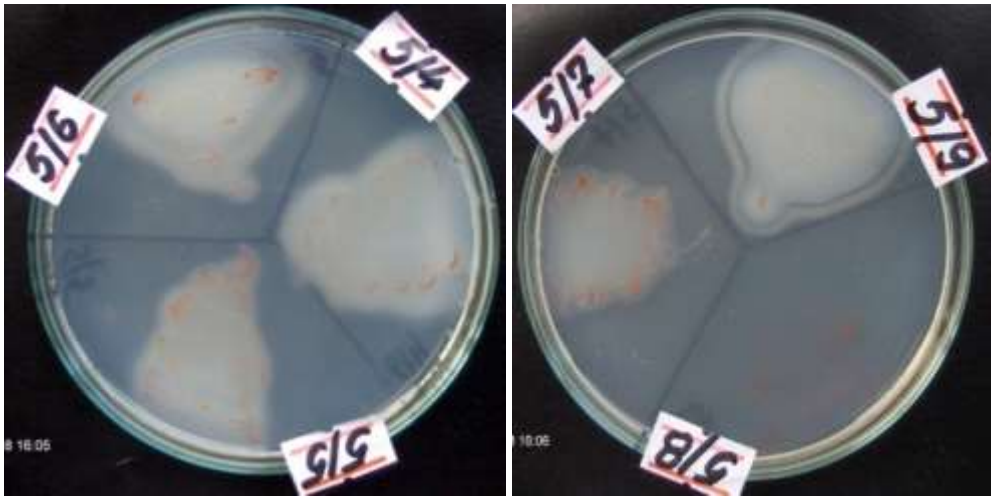

Fig. 1. - Evidenţierea activităţii esterazice prin testarea hidrolizei Tween 80 de către tulpinile haloarheene izolate din probe de apă hipersalină prelevată din lacul Grota Miresei : tulpinile pozitive (5/4 GM, 5/5 GM, 5/6 GM, 5/7 GM, 5/9 GM) au prezentat un halou în jurul zonei de creştere, comparativ cu tulpina 5/8 GM (negativă), la care nu s-a evidenţiat prezenţa acestuia.

Activitatea de sinteză a lipazelor nu a fost evidenţiată la nici una dintre cele 18 tulpini haloarheene testate, indiferent dacă acestea au fost izolate din lacul hipersalin Grota Miresei sau din cristaul de sare prelevat din Mina Unirea.

Tulpinile de microorganisme extrem halofile arheene 1CS/17 şi 1CS/28 izolate din cristal de sare, au fost capabile sa crească în prezenţa glicerolului (ca unică sursă de carbon şi energie) adiţionat la mediul de cultură HS lichid, rezultate care sugerează capacitatea acestor tulpini de a sintetiza carboxilaze (tabelul nr. 2). Aceste rezultate sunt preliminare, fiind în curs de confirmare prin experiemente realizate pe un mediu de cultură selectiv, pentru producerea decarboxilazelor.

Tabelul nr. 1 - Sinteza enzimelor hidrolitice extracelulare de către tulpini haloarheene izolate din probe de apă hipersalină prelevată din lacul Grota Miresei.

Producerea de enzime hidrolitice extracelulare	Tulpini haloarheene testate											
	5/1 GM	5/2 GM	5/3 GM	5/4 GM	5/5 GM	5/6 GM	5/7 GM	5/8 GM	5/9 GM	5/10 GM	5/11 GM	5/12 GM
Esteraze (hidroliza Tween 80)	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
Lipaze	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

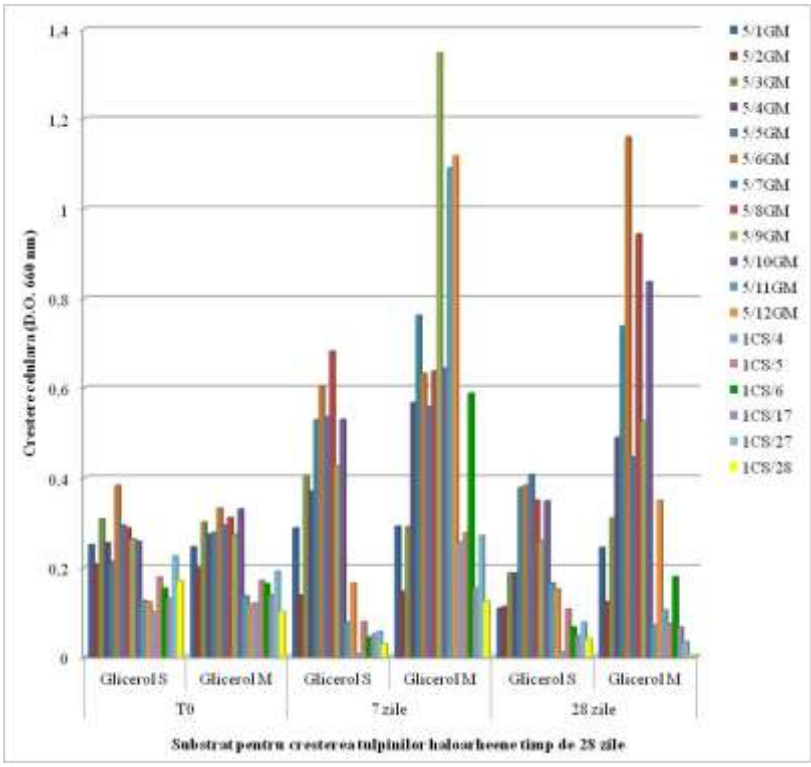

Fig. 2. - Creşterea tulpinilor haloarheene izolate din proba de apă hipersalină prelevată din lacul Grota Miresei şi din cristal de sare prelevat din Mina Unirea pe mediul lichid HS cu adiţie de glicerol (1 %) provenit de la Slobozia (glicerol S) sau Medias (glicerol M) timp de 28 zile.

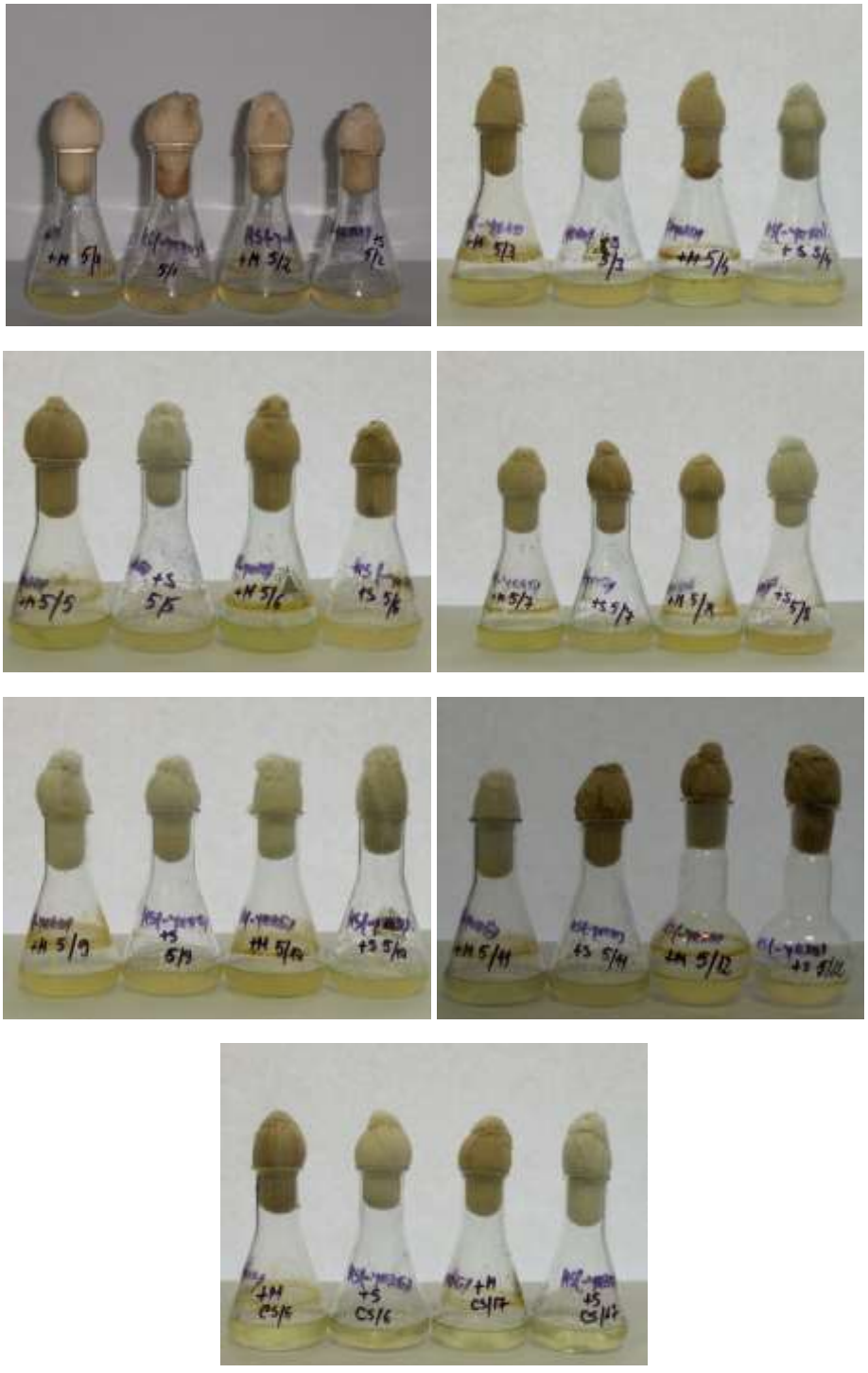

Fig. 3. Dezvoltarea tulpinilor haloarheene testate în prezenţa glicerolului provenit de la Slobozia (S) şi Medias (M) timp de 28 zile de incubare la 37^0C, în condiţii de agitare.

Testarea creşterii tulpinilor investigate pe mediul HS lichid cu adiţie de glicerol (1 %) provenit de la Slobozia (glicerol S) sau Medias (glicerol M), timp de 28 zile, în condiţii de agitare, la 37^0 C, a evidenţiat faptul că tulpinile au fost capabile să se dezvolte în prezenţa ambelor substraturi, dar au

preferat glicerolul M, densitatăţile optice determinate în prezenţa acestuia fiind superioare celor determinate în prezenţa glicerolului S.

Tabelul nr. 2. Sinteza enzimelor hidrolitice extracelulare de către tulpini haloarheene izolate din cristal de sare prelevat din mina Unirea.

Producerea de enzime hidrolitice extracelulare	Tulpini haloarheene testate					
	1CS/4	1CS/5	1CS/6	1CS/17	1CS/27	1CS/28
Esteraze (hidroliza Tween 80)	+	+	-	-	-	+
Lipaze	-	-	-	-	-	-
Decarboxilaze*	-	-	-	+	-	+

* = producerea de decarboxilaze indicată prin creşterea în prezenţa în mediu de creştere a glicerolului ca unică sursă de carbon şi energie (date preliminare, în curs de confirmare).

Creşterea celulară maximă a tulpinilor haloarheene testate a fost maximă la 7 zile de incubare (fig. 2), atât în prezenţa glicerolului provenit de la Medias, cât şi a celui de la Slobozia, după acest interval de timp dezvoltarea tulpinilor diminuându-se semnificativ (fig. 3). Rezultatele obţinute au indicat faptul că tulpinile haloarheene sunt capabile să producă decarboxilaze, necesare dezvoltării în prezenţa celor două tipuri de glicerol testate.

Potențialul de creștere bacteriană pe diferite medii de cultură în prezența glicerolului rezidual

Potenţialul de creştere bacteriană pe mediu geloză în prezenţa glicerolului rezidual

Pentru realizarea testelor, mediul a fost modificat şi utilizat în trei variante de lucru, astfel (Tabelul 3):

Tabelul nr. 3 – Variantele de lucru ale mediului de cultura utilizat

	I (g/L)	II(g/L)	III(g/L)
Extract de carne	3	6	9
Peptonă	1	20	20
Yeast	3	6	9
NaCl	5	5	5
Agar	20	20	20

1 mL de glicerol rezidual, obtinut prin amabilitatea partenerului Institutul de Cercetari Produse Organice Auxiliare SA, Medias (2 probe, una provenind de la un agent economic din Slobozia iar cealalata obtinuta de catre partenerul ICPAO Medias) a fost repartizat în plăci Petri, peste care s-a turnat geloza în cele trei variante de lucru. Plăcile s-au incubat la temperatura de 37^0C.

După 7 zile, în varianta a III-a de test, s-a observat apariţia unei colonii bacteriene de culoare lila (suprafaţă lucioasă, circulară, margine întreagă, umbonată) la suprafaţa mediului de cultură, dar şi a unei

colonii mari în profunzimea mediului de cultură, de formă neregulată, de culoare bej, din proba de glicerol rezidual de la Slobozia (Fig. 4).

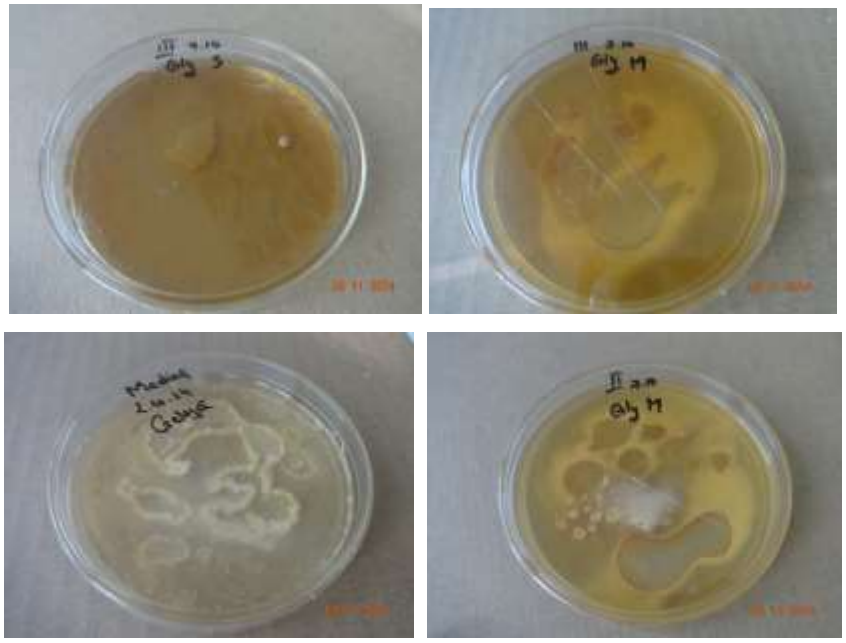

Fig. 4 - Potențialul de creștere bacteriană pe diferite medii de cultură în prezența glicerolului residual – mediu geloza

Potenţialul de creştere bacteriană pe mediu MH lichid, 10% NaCl în prezenţa glicerolului rezidual

Pentru teste, au fost selectate 5 tulpini izolate din probe de apă prelevate de la Balta Albă (august 2014). S-au repartizat câte 30 mL mediu MH 10% NaCl în baloane Erlenmeyer sterile, s-a adăugat glicerol rezidual 1% şi s-a descărcat inoculul preluat de pe suprafaţa mediului de cultură solid (buclă de ansă, 10 µL). Probele au fost incubate la 30^0C, cu agitare (150 rpm). Aprecierea creşterii bacteriene s-a constatat prin măsurarea densităţii optice la spectrofotometru (660 nm), la interval de 24 h, folosind drept martor mediul de cultură fără glicerol. Rezultatele sunt prezentate in tabelele nr. 4 si 5.

Tabelul nr. 4 - Monitorizarea creşterii bacteriene în prezenţa glicerolului rezidual (Slobozia)

Tulpina	Densitatea optică (λ=660 nm)					
	T_0	T_{24h}	T_{48h}	T_{72h}	T_{96h}	T_{144h}
1-2	0.002	1.575	2.132	2.361	2.487	2.595
2-1	0.037	1.788	1.985	2.218	2.297	2.239
3-8	0.013	1.500	1.971	2.266	2.385	2.646
4-2	0.034	1.726	1.954	2.159	2.244	2.114
5-1	0.068	1.637	1.868	2.036	2.050	1.817

Potenţialul de creştere bacteriană pe mediu R AGAR lichid cu 5% NaCl

Pentru realizarea testelor s-a utilizat o tulpină de referinţă din colecţia JCM 2472, *Marinococcus halophilus*. Mediul de cultură utilizat a fost R AGAR lichid, cu următoarea compoziţie (g/L): NaCl, 50;

Bacto peptonă, 10; yeast extract, 5; extract de malț, 5; acizi casamino, 5; beef extract, 2; glicerol, 2; Tween 80, 0.05; $MgSO_{4X}7H_2O$, 1. Datele obtinute se regasesc in tabelul nr. 6

Tabelul nr. 5 - Monitorizarea creșterii bacteriene în prezența glicerolului rezidual (Mediaș)

Tulpina	Densitatea optică (λ=660 nm)					
	T_0	T_{24h}	T_{48h}	T_{72h}	T_{96h}	T_{144h}
1-2	0.044	1.619	2.169	2.388	2.465	2.458
2-1	0.061	2.135	2.294	2.380	2.374	2.063
3-8	0.021	1.789	2.414	2.490	2.499	2.522
4-2	0.039	2.087	2.267	2.462	2.404	2.278
5-1	0.047	0.079	0.046	0.095	0.115	0.156

Tabelul nr. 6 - Aprecierea creșterii bacteriene în prezența glicerolului rezidual

Tulpina	Proba- Slobozia			Proba- Mediaș		
	Densitatea optică (λ=660 nm)			Densitatea optică (λ=660 nm)		
	T_0	T_{24h}	T_{48h}	T_0	T_{24h}	T_{48h}
Marinococcus halophilus	0.017	0.593	1.644	0.013	0.013	0.023

Evidențierea activității lipazelor

Capacitatea de producere a lipazelor a fost testată pe mediul MH agarizat, cu următoarea compoziție (g/L): yeast extract, 10; proteose peptonă, 5; glucoză, 1; NaCl, 100; $MgCl_2x6H_2O$, 7; $MgSO_{4X}7H_2O$, 9.6; $CaCl_2x2H_2O$, 0.36; KCl, 2; $NaHCO_3$, 0.06; NaBr, 0.026; agar, 20 (Ventosa și colab., 1972). Mediul de bază a fost suplimentat cu ulei de măsline 1.25 % și rodamină 0.001%. În mediul solidificat s-au realizat godeuri în care s-au inoculat 200 µL de cultură bacteriană lichidă. Plăcile astfel inoculate au fot incubate timp de 48h, la 30^0C. Reacția pozitivă a fost indicată de apariția unui halou fluorescent roșu-portocaliu în jurul ariei de creștere a tulpinilor bacteriene. Rezultatele au fost centralizate in tabelul nr. 7.

Tabelul nr. 7 - Activitatea lipazică a unor tulpini de microorganisme izolate din probe de apă și sol prelevate de la Balta Albă

Nr. crt.	Tulpina	Activitatea lipazica	Nr. crt.	Tulpina	Activitatea lipazica
1	1-2	+/-	11	3-2	+++
2	1-3	-	12	3-4	-
3	1-4	-	13	3-5	+
4	1-6	++	14	3-6	-
5	1-8	++	15	3-7	++
6	1-9	++	16	3-8	+
7	2-1	-/+	17	4-2	+
8	2-3	++	18	5-1	+
9	2-4	-	19	5-2	+
10	3-1	-	20	T-4	-
			21	T-5	-

Evidențierea decarboxilazelor (lizin-decarboxilaza, ornitin-decarboxilaza, arginin-decarboxilaza) la tulpini de microorganisme halofile

Mediul utilizat pentru testarea prezenței acestor enzime are următoarea compoziție (g/L): peptic digest of animal tissue 5, yeast extract 3, dextroza 1, brom cresol purpur 0.02, la care se adaugă lizină, ornitină sau arginină în concentrație de 0.5%. Detectarea decarboxilazelor se realizează pe baza evidențierii unei variații de pH. Se repartizează câte 4.5 mL mediu steril în tuburi și se transferă aseptic un volum de 0.5 mL inocul bacterian, la care se adaugă 2-3 mL de ulei de parafină. Tuburile inoculate sunt incubate la 35º-37ºC pentru 24h. Fermentarea glucozei de către bacteriile cu metabolism fermentativ conduce la acidifierea mediului ceea ce face ca indicatorul de pH (brom cresol purpur) să determine schimbarea culorii mediului de la violet la galben. Cultura este incubată pentru încă 24h la 35º-37ºC pentru a permite microorganismelor să utilizeze aminoacidul. Dacă tulpina bacteriană nu prezintă decarboxilaze în echipamentul lor enzimatic, mediul rămâne galben, iar în prezența acestor enzime are loc o realcalinizare secundară a mediului datorită formării diaminelor (revenirea mediului la culoarea violet).

EXPERIMENTE DERULATE CU CIANOBACTERII SI BACTERII HETEROTROFE

Experimentele pentru realizarea acestei etape s-au desfăşurat astfel:

1. Intr-o primă fază s-a procedat **la îmbogăţirea** în microorganisme capabile de a utiliza glicerolul rezidual ca unică sursă de carbon pentru creşterea şi multiplicarea celulară;
2. Culturile îmbogăţite astfel obţinute au fost **purificate** pentru selectarea acelor microorganisme capabile de a utiliza glicerolul rezidual ca unică sursă de carbon pentru creşterea şi multiplicarea celulară;
3. In final a fost **selectată o singură tulpină** caracterizată printr-o viteză foarte mare de creştere şi multiplicare, comparativ cu toate celelalte tulpini; tulpina produce colonii cu diametrul de 1,5 – 2 cm în 48 ore de la inoculare.

Rezultate obtinute:

1. Obţinerea de amestecuri de populaţii îmbogăţite în microorganisme capabile de a utiliza glicerolul rezidual ca unică sursă de carbon pentru creşterea şi multiplicarea celulară s-a făcut prin utilizarea unui mediu mineral (BG 11) suplimentat cu glicerol rezidual (1% concentraţie finală), din cele două surse disponibile S (Slobozia) şi M (Mediaş). Folosirea glicerolului rezidual are ca scop izolarea unor microorganisme capabile de a fi crescute pe medii ieftine ceea ce ar fi un avantaj în cultivarea lor pe scară largă. Cultivarea s-a făcut pe mediu lichid timp de trei săptămâni cu pasaje săptămânale în mediu proaspăt.
2. Culturile îmbogăţite au fost utilizate pentru obţinerea de culturi pure. Diluarea culturilor îmbogăţite (10^{-6}, 10^{-7}) şi însămânţarea lor pe mediul solidificat (BG 11 suplimentat cu 1% glicerol

rezidual -S- , conţinând 20g agar la litru) a condus la obţinerea de colonii izolate. Dintre coloniile astfel izolate s-a selectat o colonie caracterizată printr-o rată de creştere foarte mare.

3. Colonia a fost propagată atât în mediul lichid cât şi în mediul solidificat (unde a reconfirmat capacitatea mare de creştere şi multiplicare), conţinând glicerol rezidual. De asemenea tulpina a fost crescută şi în mediul BG 11 suplimentat fie cu ulei de măsline fie cu ţiţei, ambele surse complexe de carbon necesitând pentru catabolizare prezenţa activă în echipamentul enzimatic a lipazelor şi esterazelor. Biomasa rezultată din creşterea cu glicerol rezidual şi cea crescută cu ulei de măsline a fost recoltată prin centrifugare, păstrată la -20^{0}C şi trimisă spre analiză biochimică la partenerul 1; în mod similar fazele lichide rămase după separarea biomasei au urmat aceeaşi cale. Tulpina selectată a fost inspectată la microscopul optic, în figura 5 fiind vizibil aspectul microscopic după colorarea cu cristal violet (a si b) sau marcarea cu fluorocromul acridin orange (c şi d) .

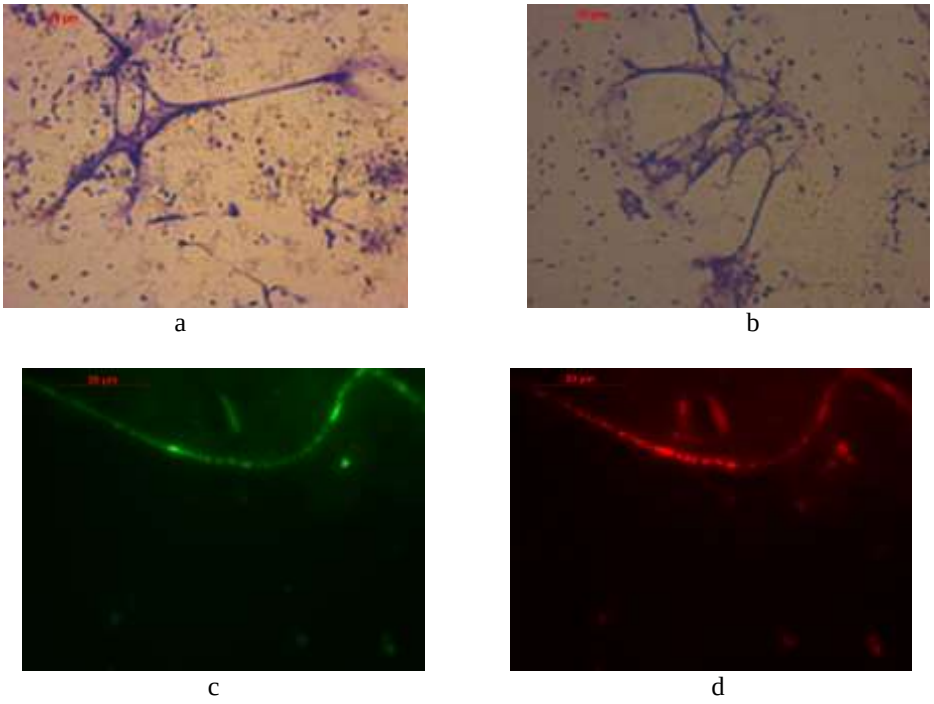

Fig. 5 - Aspectul microscopic al tulpinii selectate: a) şi b) colorare cu cristal violet; c) şi d) marcare cu acridin oranj (filtrul verde- fluorescenţă acridin oranj legat de ADN; filtru rosu - fluorescenţă acridin oranj legat de ARN)

Tulpina, capabilă de a creşte si cu ulei de măsline sau ţiţei, a fost inspectată şi macroscopic. Aspectul macroscopic al culturilor izolatului este ilustrat in figura nr 6. Experimentele preliminare au demonstrat ca izolatul are capacitatea de a sintetiza si elimina in mediul extracelular structuri de natura proteica cu activitate lipolitica (test efectuat cu rodamina B – fig. 7).

A B C

Fig. 6 - Aspectul macroscopic al izolatului cultivat cu glicerol rezidual (A), ulei de măsline (B) şi ţiţei (C), ca sursă de carbon

Fig. 7 – Evidentierea activitatii lipolitice in cazul izolatului

In concluzie, s-a selectat o tulpină cu creştere foarte rapidă pe mediu mineral BG11 cu glicerol rezidual (S) ca unică sursă de carbon, tulpină capabilă de a utiliza ca sursă de carbon pentru creştere şi multiplicare uleiul de măsline sau ţiţeiul.

Studiul teoretic privind potentialul plantelor ca surse ale enzimelor de interes in cadrul proiectului

În plantele superioare, rezerva principală de stocare a carbonului în semințe de este triacilglicerolul. În timpul germinării semințelor, triacilglicerolul se descompune la acizi grași și glicerol. Acizii grași sunt transformați în zaharoză prin ciclul glioxilat pentru a susține creșterea plantulei. Experimentele de marcare radio au demonstrat, de asemenea, că glicerolul poate fi convertit în zaharoză. Contribuția carbonului stocat în glicerol este relativ mică, fiind estimat de 5% din totalul carbonului. Au fost propuse două căi probabile de catabolism al glicerolului. În prima cale, glicerolul este fosforilat la glicerol-3-fosfat de glicerol kinaza și apoi transformat în fosfat de dihidroxiacetonă de glicerol-3-fosfat dehidrogenaza. În cea de a doua cale, glicerol este covertit la dihidroxiacetonă de glicerol dehidrogenaza dependentă de NAD și apoi fosforilat la fosfat dihidroxiacetonă de dihidroxiaceton kinaza.

Prima cale, în plante, este susținută de următoarele probe: activitățile glicerol kinazei și glicerol-3-fosfat dehidrogenazei sunt detectate în semințele germinate, în timp ce activitatea glicerol dehidrogenazei NAD-dependentă nu este detectata; cea mai înaltă expresie a genelor glicerol kinazei și

glicerol-3-fosfat dehidrogenază dependentă de FAD sunt detectate în timpul germinării semințelor; gena mutantă a glicerol kinazei, *gli1*, de la *Arabidopsis* perturbă catabolismul glicerolului și se acumulează glicerol. Este de remarcat faptul că, în plus față de gena mitocondrială glicerol-3-fosfat dehidrogenază dependentă de FAD, plantele au, de asemenea, glicerol-3-fosfat dehidrogenaza dependentă de NAD citosolic și plastidial, care poate converti glicerol-3-fosfat la fosfat dihidroxiacetona. Dar glicerol-3-fosfat dehidrogenază dependentă de NAD este puțin probabil să fie implicată în degradarea glicerolului deoarece echilibrul este înclinat permanent în direcția sintezei de glicerol-3-fosfat. Produsul de degradare a glicerolului, fosfat dihidroxiacetona, poate fi convertit în zaharuri prin gluconeogeneza.

STUDIUL EXPERIMENTAL AL INTERACTIEI LIPAZA – GLICEROL PENTRU SINTEZA GLICEROL CARBONATULUI

A fost studiat comportamentului enzimei de tip lipaza in reactia de sinteza a carbonatului de glicerol. Procesul s-a desfasurat in batch. Mediul e reactia s-a obtinut prin amestecarea a 0.1 g glicerol, 1 mL dimetil carbonat (DMC) si 20 mg lipaza. Amestecul de reactie a fost incubat pentru 24 ore la temperatura de 60 grade Celsius. Analiza amestecului e reactia s-a realizat pe baza metodei GC-MS si GC-FID pentru a ientifica si apoi a cuantifica continutul de produsi de reactie. Mecanismul de reactie propus in literatura atat pentru cataliza bazica cat si pentru biocataliza (figura 8) impune realizarea unui intermediar instabil (3) si a unei molecule de metanol (MeOH) in urma interactiei dintre glicerol si DMC care se stabilizeaza printr-un mecanism de ciclizare intramoleculara. Astfel, se formeaza glicerol carbonat (4) si o noua molecula de MeOH. Existenta unui exces de DMC in mediul de reactie permite formarea unor compusi secundari de tipul dicarbonat de glicerol (5) si dicarbonat de triglicerol (6).

Sistemul de reactie propus tine cont de conceptele Chimiei Verzi. S-a urmarit eliminarea solventului organic si utilizarea reactivului DMC cu rol dublu, agent de carboxilare si mediu de reactie. Experimentele de inceput au avut drept scop stabilirea sursei de enzima lipaza care sa-si pastreze activitatea catalitica in prezenta DMC.

Au fost testate surse de lipaza comerciale de tipul *Aspergillus niger, Pseudomonas fluorescens, Phizopus arrhizus, Candida cylindracea, Pseudomonas cepacia, Mucor miehei, Aspergillus sp, Porcina pancreas, Phizopus niveus, Hog pancreas* and *Thermomyces lonuginosus.*

S-a evaluat activitatea enzimatica direct in mediul de reactie, prin calcularea conversiei glicerolului si a selectivitatii in glicerol carbonat (figura 9). Conditiile de reactie sunt specifice biocatalizei omogene pentru care enzima catalizator este dispersata in mediul de reactie.

Datele experimentale obtinute au demonstrat faptul ca doar trei din cele douasprezece surse de lipaza testate au prezentat activitate enzimatica, si anume *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica* si *Aspergillus niger*. Cele trei tipuri de lipaza au permis obtinerea de conversii in glicerol cu valori

asemanatoare (in jurul valorii de 70 %) (figura 9). Totusi, eficienta acestor surse de lipaza se diferentiaza pe baza selectivitatii in glicerol carbonat. Astfel, *Aspergillus niger* prezinta cea mai buna selectivitate in valoare de 58% pentru glicerol carbonat (figura 9).

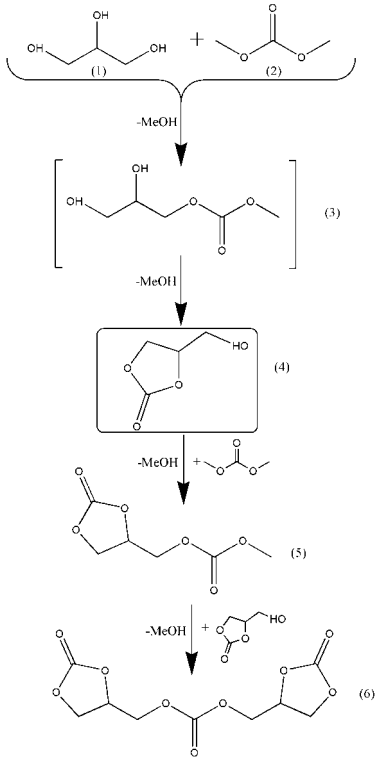

Fig. 8. Reactia de transesterificare dintre (1) glicerol si (2) dimetil carbonat (DMC) in urma careia se obtine (3) intermediar instabil generand (4) carbonat de glicerol ca produs principal si (5) dicarbonat de glicerol sau/si (6) dicarbonat de triglicerol ca produsi secundari.

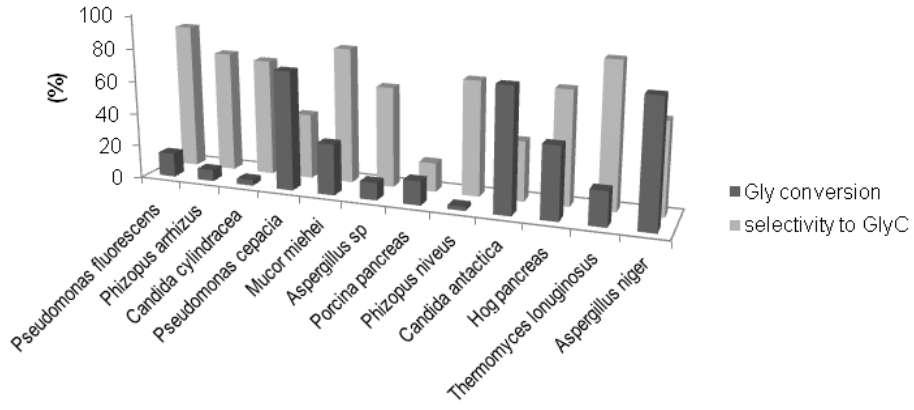

Fig. 9. Sreening pe lipaza pentru sinteza glicerolului. Conditii de reactie: 0.1 g glicerol, 1 mL DMC si 0.02 g enzima; temperatura de 60 ^{0}C; timp de incubare 48 ore.

Metodele de sinteza biocatalitica raportate in literatura folosesc in exclusivitate *Candida antarctica*. Experimentele de fata au pus in evidenta existenta unei noi surse de lipaza pentru sinteza

glicerol carbonat, si anume *Aspergillus niger*, care a fost stabilita a fi sursa de biocatalizator pentru experimentele urmatoare dedicate prepararii biocatalizatorului heterogen.

Datele experimentale obtinute au demonstrat faptul ca doar trei din cele douasprezece surse de lipaza testate au prezentat activitate enzimatica, si anume *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica* si *Aspergillus niger*. Cele trei tipuri de lipaza au permis obtinerea de conversii in glicerol cu valori asemanatoare (in jurul valorii de 70 %) (figura 9). Totusi, eficienta acestor surse de lipaza se diferentiaza pe baza selectivitatii in glicerol carbonat. Astfel, *Aspergillus niger* prezinta cea mai buna selectivitate in valoare de 58% pentru glicerol carbonat (figura 9). Metodele de sinteza biocatalitica raportate in literatura folosesc in exclusivitate *Candida antarctica*. Experimentele de fata au pus in evidenta existenta unei noi surse de lipaza pentru sinteza glicerol carbonat, si anume *Aspergillus niger*, care a fost stabilita a fi sursa de biocatalizator pentru experimentele urmatoare dedicate prepararii biocatalizatorului heterogen.

Activitatea catalitica a lipazelor este preponderent influentata de caracteristicile mediului de reactie. Acest fapt se datoreaza interdependentei dintre mecanismului catalitic si structura moleculei de lipaza. Molecula lipazei prezinta o zona ce actioneaza ca un “capac” pentru centrul catalitic activ al enzimei, restrictionand accesul substratului in functie de conditiile experimentale. Un mediu de reactie hidrofobic sau chiar molecule-substrat cu caracter hidrofobic induce o modificare conformationala generand forma activa a enzimei (orienteaza “capacul” in pozitia “deschis” si permite accesul substratului la centrul catalitic). Prezenta interactiilor hidrofilice duce la inchiderea accesului catre centrul catalitic activ al enzimei. Complexitatea mecanismului catalitic al lipazele ingreuneaza modelarea si controlul procesului biocatalitic corespunzator atat in laboratorul de cercetare cat si la scara industriala.

Cunoscand faptul ca reactia propusa pentru sinteza carbonatului de glicerol in cataliza enzimatica conduce adesea la produsi de reactie dificil de izolat si de identificat, probele obtinute in urma sintezei au fost supuse analizelor GC-MS si RMN. Astfel s-a pus in evidenta prezenta carbonatului de glicerol ca produs de reactie principal. Urmeaza a se realiza un studiu asupra celorlalti produsi de reactie pentru identificarea si cuantificarea lor.

STUDIUL EXPERIMENTAL AL INTERACTIEI MICROORGANISM – GLICEROL

Biomasa produsa de partenerul CO a fost testata in sistemul indicat anterior pentru a evalua activitatea biocatalitica in procesele de transesterificare si decarboxilare necesare sintezei compusilor de interes (glicerol carbonat si glicidol). A fost analizata atat masa celulara, cat si supernatantul folosit drept mediu de cultura. Testarea supernatantului s-a facut pe baza supozitiei prin care biomasa celulara ar putea elimina o parte din proteinele generate. S-a urmarit punerea in evidenta a prezentei celor doi produsi de interes (glicerol carbonat si gliciol). Tabelul nr. 8 contine atat o descriere sumara a probelor testate, cat si rezultatele obtinute.

Tabelul nr. 8 – Descrierea probelor utilizate si rezultatele obtinute privind prezenta compusilor de interes

Proba	Descriere proba	Glicidol	Glicerol carbonat	Alti produsi
P1	Glicerol celule 31.10.2014	+ conc. mica	+ conc. mica	-
P2	Marinococcus halophilus R-AGAR 5%NaCl 14.11.2014 –biomasa	-	+	+
P3	1-9 MH 10% NaCl 14.11.14 –biomasa-	-	+	-
P4	Supernatant ulei 31.10.2014	-	-	-
P5	Glicerol 31.10.2014	-	-	-
P6	Supernatant ulei filtrate 31.10.2014	-	-	-
P7	Marinococcus halophilus R-AGAR 5%NaCl 14.11.2014 –supernatant-	-	+	+
P8	MH 10% NaCl 14.11.14 –supernatant-	+	+	-
P9	Marinococcus halophilus R-AGAR 5%NaCl 14.11.2014 (falcon mic)	+	+	+
P10	1-9 MH 10% NaCl 14.11.14(falcon mic)	+ conc. mare	+	+

Probele de biomasa (P1, P2 si P3), in general, au prezentat activitate biocatalitica redusa. Acest lucru poate fi explicat pe baza mecanismului biochimic complex implicat in procesul de sinteza care presupune etape de penetrare a membranei celulare de catre reactanti (glicerol si DMC), dar si eliminarea prousilor de reactie. Toti acesti pasi aditionali sintezei propriu-zisa determina scaderea randamentului final. Biomasa celulara cu origini in mediul biodiesel (P1) a prezentat activitate in sinteza glicidolului. Totodata, toate cele trei tulpini testate (P1, P2 si P3) au prezentat activitate catalitica in sinteza glicerol carbonatului. Totusi, amestecului de reactie a fost sarac in produsi de interes (concentratii mici e glicerol carbonat si glicidol).

Analiza probelor P4, P5 si P6 a pus in evidenta prezenta unei concentratii foarte mare de glicerol in amestecul final de reactie. Acest fapt a impiedicat realizarea unor analize GC-FID eficiente. In cazul acestor probe, se va propune un alt protocol de analiza (dilutia probelor si derivatizarea acestora inainte de a fi introduse in sistemul GC-FID).

In probele P8, P9 si P10 au fost pusi in evidenta ambii produsi de interes (glicerol carbonat si glicidol). Proba P10 a fost cea mai bogata in continut de glicidol. Totodata, aceste probe au prezentat si produsi secundari. Nu s-a determinat structura acestora, pentru moment.

In concluzie, testele realizate au permis punerea in evidenta a activitatii biocatalitice pentru biomasa generata de partenerul CO. Se va urmari in continuare posibilitatea de exprimare a masei proteice specifice probelor P8, P9 si P10. Totodata se are in vedere analiza probelor P4, P5 si P6 pentru a evalua continutul real in glicerol carbonat si glicidol.

Aceste concluzii experimentale vor permite realizarea activitatii propuse pentru etapa urmatoare (2015).

Activitatea 1.3. – Realizarea site-ului proiectului

Rezultatele si informatiile publice aferente proiectului BioGlyCat sunt disponibile si in format electronic pe pagina realizata de catre coordonatorul proiectului, Institutul de Biologie Bucuresti, la adresa:

http://www.ibiol.ro/proiecte/PNII/BioGlyCat/index.htm

Pagina de internet va fi actualizata pe parcursul derularii proiectului cu toate informatiile necesare.

Activitatea 1.4 – Date teoretice - adaptarea sistemului biocatalitic la instalatia pilot

In cadrul proiectului BioGlyCat se propune utilizarea glicerolului rezidual separat din amestecul biodiesel ca materie primă pentru producerea derivaţilor glicerolului (GlyC, GlyD şi poliglicerol) atât la scară de laborator cât si la scară de unitate pilot. In cadrul etapei experimentale privind adaptarea sistemului biocatalitic la instalatia pilot se va evalua efectul de matrice a glicerolului rezidual asupra procesului biocatalitic propus. In acest sens se va realiza un screening de probe în care glicerolul rezidual va avea ca origini vegetale uleiuri din plante diferite (ex. porumb, rapiţă, floarea-soarelui, măsline, palmier etc) sau uleiuri reziduale supuse unor tratamente termice diferite (ex. temperaturi de ardere sau agenţi de reacţie diferiţi). Procesul biodiesel în sine se poate desfăşura în condiţii variate, luând în considerare tipul reactivului de transesterificare, catalizatorul folosit, procentul de apă din amestecul de reacţie etc, care vor influenţa compoziţia finală a matricei glicerolului rezidual (tipul şi concentraţia impurităţilor). Toate aceste aspecte vor fi evaluate cu scopul de a stabili un portofoliu de surse-biomasă care să permită obţinerea de glicerol rezidual util producerii derivaţilor glicerolului (GlyC, GlyD şi poliglicerol) de interes industrial. Se are in vedere ca sistemul biocatalitic propus sa funcţioneze în regim de flux continuu. Utilizarea unui sistem biocatalitic selectiv în GlyC şi GlyD va permite reducerea drastică a timpului de contact între catalizatori şi reactanţi menţinând totuşi o eficienţă adecvată a convertirii glicerolului în derivaţi. Acest lucru este deja confirmat pentru sinteza biocatalitică a GlyC pentru care timpul de reacţie este de 4 ore în biocataliză faţă de minim 10 ore în cataliza convenţională, deşi performanţele sunt asemănătoare. Astfel, in cadrul proiectului BioGlyCat se va dezvolta un sistem biocatalitic original în condiţii de flux continuu, care va fi construit la scară industrială sub forma unei unităţi pilot dedicate producerii derivaţilor glicerolului (GlyC, GlyD şi poliglicerol).

Conversia biocatalitică a glicerolului se va efectua utilizand un biocatalizator cooperativ-dual (*amestec* de enzime - lipaza şi decarboxilaza) în format heterogen (enzime imobilizate pe suport solid). Procesul biocatalitic corespunzător se desfăşoară în două etape succesice:

1) carbonilarea glicerolului cu dimetil carbonat şi obţinerea GlyC în prezenţă de lipază şi

2) transformarea GlyC în GlyD şi apoi în poliglicerol, proces catalizat de decarboxilază.

Procesul biocatalitic ce va fi dezvoltat in cadrul proiectului porneşte de la glicerol şi se încheie cu obţinerea GlyC, GlyD şi poliglicerolului, desfăşurarea lui fiind condiţionată de prezenţa unui

biocatalizator cooperativ-dual compus din lipază şi decarboxilază. Sistemul biocatalitic operaţional va fi optimizat în condiţii de flux continuu. Varianta optimizată a sistemului biocatalitic va fi proiectată, testată şi evaluată la scară industrială prin realizarea unei instalaţii pilot dedicate producerii derivaţilor glicerolului.

Rezultatele etapei 1:

Denumire etapa: Biocatalizatori – screening general

Institutii implicate: Institutul de Biologie Bucuresti al Academiei Romane - CO

Universitatea Bucuresti – Facultatea de Chimie – P1

Rezultate asteptate:

- Enzima 1 – lipaza; Enzima 2 – decarboxilaza

Rezultate obtinute:

- Enzima 1 – lipaza; Enzima 2 – decarboxilaza
- Pagina de internet a proiectului
- 1 lucrare ISI in subiect comun cu al proiectului
- 2 lucrari BDI in subiect comun cu al proiectului
- 1 lucrare in volumul unei conferinte neindexate ISI
- Participarea la 4 conferinte stiintifice de specialitate

Lucrare ISI:

Simona Neagu, Silviu Preda,Crina Anastasescu, Maria Zaharescu, Mădălin Enache, Roxana Cojoc, **2014**, *The functionalization of silica and titanate nanostructures with halotolerant proteases*, Rev. Roum. Chim., 59, 97-103.

Lucrari BDI:

Mădălin Enache, Simona Neagu, Roxana Cojoc, **2014**, *Extracellular hydrolases of halophilic microorganisms isolated from hypersaline environments (salt mine and salt lakes)*, Scientific Bulletin Series F "Biotechnologies", XVIII, 20 – 25.

Madalin Enache, Roxana Cojoc, Akinobu Echigo, Hiroaki Minegishi, Takashi Itoh, Masahiro Kamekura**, 2014,** *Taxonomy of a novel extremely halophilic archaeon belonging to the genus Haloarcula isolated from a low saline environment, Techirghiol Lake, Romania*, Oltenia. Studii şi Comunicări. Stiinţele Naturii, 30 (1), 192 – 197.

Lucrare Volum:

Madalin Enache, **2014**, *Influenta tariei ionice asupra amilazelor produse de catre microorganisme halofile archaeane izolate din lacuri saline si hipersaline din Romania*, Proceedings of the international conference "Genetics, Physiology and Plant Breeding", V-th edition, 200 – 204.

Prezentari orale conferinte:

Mădălin Enache, Simona Neagu, Roxana Cojoc, *Extracellular hydrolases of halophilic microorganisms isolated from hypersaline environments (salt mine and salt lakes)*, June 5 – 7, **2014**, Bucharest, Romania, Agriculture for life, life for agriculture, USAMV Intl Conf.

Madalin Enache, Roxana Cojoc, Akinobu Echigo, Hiroaki Minegishi, Takashi Itoh, Masahiro Kamekura**,** *Taxonomy of a novel extremely halophilic archaeon belonging to the genus Haloarcula isolated from a low saline environment, Techirghiol Lake, Romania*, 11th to 13th of September **2014** – BIODIVEST 2014, 21th edition of The International Conference "The Museum and the Scientific Research" organized by The Department of Natural Sciences of The Museum of Oltenia Craiova, with the support of The County of Dolj Council, Romania

Gabriela Teodosiu, Simona Elena Neagu, Madalin Enache, *Microorganisme halofile – resurse de biocompusi cu aplicatii bionanotehnologice, "Valorificarea durabila a resurselor si mediul inconjurator"* Masa rotunda – Bucuresti – 16 octombrie **2014** – INCD-ICPMRR – CENTIREM

Poster conferinta:

Madalin Enache, *Influenta tariei ionice asupra amilazelor produse de catre microorganism halofile archaeane izolate din lacuri saline si hipersaline din Romania*, The international conference "Genetics, Physiology and Plant Breeding", V-th edition, Chisinau, Republic of Moldova, 23-24 October 2014

Referinte bibliografice

1. C.H.Zhou, J.N.Beltramini, Y.X.Fan, G.Q.Lu, Chemical Society Review, 2008, 37, 527-549.
2. M.Pagliaro, R.Ciriminna, H.Kimura, M.Rossi, C.D.Pina, Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 4434 – 4440.
3. M.Tudorache, A.Negoi, L.Protesescu, V.I.Parvulescu, Applied Catalysis B: Environmental, 2013, 10.1016/j.apcatb.2012.12.033
4. M.Tudorache, A.Nae, S.Coman, V.I.Parvulescu, RSC Advances, 2013, 3, 4052-4058.
5. M.Tudorache, A.Negoi, B.Tudora, V.I.Parvulescu, Applied Catalysis B: Environmental, 2013, 10.1016/j.apcatb.2013.02.049.
6.M.O.Sonnati, S.Amigoni, E.P.T de Givenchy, T.Darmanin, O.Choulet, F.Guittard, Green Chemistry, 2013, 15, 283-306.
7.S.M.Gade, M.K.Munshi, B.M.Chherawalla, V.H.Rane, A.A.Kelkar, Catalysis Communications 2012, 27, 184–188.
8. S.Liu, M.Rebros, G.Stephens, A.C.Marr, Chemical Communications,
2009, 2308–2310
9. R.Wohlgemuth, Current Opinion in Biotechnology, 2010, 21, 713–724.
10. M.V.Sotenko, M.Rebros, V.S.Sansa, K.N.Loponova, M.G.Davidsonc,
G.Stephensd, A.A.Lapkina, Journal of Biotechnology, 2012, 162, 390– 397.
11. W.Rymowicz, A.Rywińska, W.Gladkowski, Chem Pap, 2008, 62, 239-246.
12. S.Sato, N.Morita, D.Kitamoto, T.Yakushi, K.Matsushita, H.Habe, AMB Express 2013, 3, 20.
13. S.Y.Lee, S.H.Hong, S.H.Lee, S.J.Park, Macromol Biosci, 2004, 4, 157-164.
14. M.D.Blankschien, J.M.Clomburg, R.Gonzalez, Metab Eng, 2010, 12, 409-419.
15.M.Tudorache, A.Negoi, A.Nae, L.Protesescu, V.I.Parvulescu, New Biotechnology, 2012, 29 (supplement), 23-26.
16.M.Tudorache, L.Protesescu, A.Negoi, V.I.Parvulescu, Applied Catalysis A: General, 2012, 437-438, 90-95.
17. Y.Zhang, F.Gao, S-P.Zhang, Z-G.Su, G. Ma, P.Wang, Bioresource Technology 2011, 102, 1837–1843.
18. S.C.Kim, Y.H.Kim, H.Lee, D.Y.Yoon, B.K.Song, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007,49, 75–78.
19. Oren A., Litchfield C. D., 1999, A procedure for the enrichment and isolation of *Halobacterium*, FEMS Microbiology Letters, 173: 353–358.
20. Bhatnagar T., Boutaiba S., Hacene H., Cayol J.-L., Fardeau M.-L., Ollivier B., Baratti J.C., 2005, Lipolytic activity from Halobacteria: Screening and hydrolase production, FEMS Microbiology Letters 248 (2005) 133–140.
21. Ozcan B., Ozyilmaz G., Cokmus C., Caliskan M., 2009, Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains, J Ind Microbiol Biotechnol (2009) 36:105–110.