



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00948

(22) Data de depozit: 29/11/2016

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• CORNEA PETRUȚA CĂLINA,
STR. MUȘAT CONSTANTIN NR. 1, BL. 16,
SC. 2, AP. 25, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;

• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ISRAEL ROMING-FLORENTINA,
STR. HAGI GHIȚĂ 77, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRITA NR.12, BL.4,
SC.1, ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
B, RO;
• VOAIDES CĂTĂLINA MIHAELA,
ALEEA CIOPLEA NR. 4, BL. ANL, ET. 1,
AP. 16, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• BURLACU AGLAIA,
STR. TUDOR VLADIMIRESCU BL.5, AP. 5,
MOINEȘTI, BC, RO

(54) **PROCEDEU DE SELECȚIE A CONSORTIILOR
DE MICROORGANISME DESTINATE BIORAFINĂRII
MATERIALULUI VEGETAL CU CONȚINUT RIDICAT
DE FITO-SILICIU**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu pentru selecția consortiilor de microorganisme destinate biorafinării materialului vegetal cu conținut ridicat de fito-siliciu. Procedeu conform invenției constă în compararea dezvoltării coloniilor cultivate separat pe o placă cu 96 de godeuri, cu mediu mineral minimal, gelifiat cu 2% agar, conținând 1% complex de celuloză cu xilani ca unică sursă de carbon, și a coloniilor co-cultivate în matrice

de 96 de colonii, rezultate din 12 colonii distribuite randomizat în 8 repetiții pe același mediu mineral minimal, selectându-se cu randament ridicat consortiile compatibile din tulpinile selectate care produc celuloze, xilanaze, silicaze și feruloil- esteraze, și/sau (poli) peptide amplificatoare ale acțiunii celulelor.

Revendicări: 6



PROCEDEU DE SELECȚIE AL CONSORTIILOR DE MICROORGANISME DESTINATE BIORAFINĂRII MATERIALULUI VEGETAL CU CONȚINUT RIDICAT DE FITO-SILICIU

Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru selecția consorțiilor de microorganisme care produc amestecuri de enzime și/sau (poli)peptide ce amplifică acțiunea enzimelor destinate etapelor inițiale de biorafinare a materialului vegetal cu un conținut ridicat de fito-siliciu.

Sunt cunoscute diferite procedee de selecție a tulpinilor de microorganisme care produc amestecuri de enzime și/sau (poli)peptide utilizabile în etapele inițiale de biorafinare biochimică a materialului vegetal. Majoritatea procedeele de selecție descrise au ca scop identificarea tulpinilor producătoare de hidrolaze care acționează asupra polizaharidelor din matricea lignocelulozică. Brevetul US 9139861 B1 protejează utilizarea unui mediu gelifiat cu celuloză, pentru selecția microorganismelor care produc celulaze. Mediul agarizat cu celuloză ca substrat nutritiv este obținut prin amestecarea unei suspensii de celuloză în apă, cu o vâscozitate dinamică de 12-35 mPas, cu o soluție de 2,5 mg/ml celuloză în dimetilacetilamidă, care conține 8% (masă /volum) clorură de litiu.

Cererea de brevet CN102212608 A propune utilizarea plăcilor de microtitrare cu 96 godeuri, iar în fiecare godeu se determină activitatea celulazică din supernatantele mediilor de cultură ale unor izolate de microorganisme. Substratul folosit este o suspensie fină de material vegetal supus pre-tratamentului de expandare cu abur, iar evidențierea grupărilor glucidice reducătoare eliberate prin hidroliza substratului sub acțiunea celulazelor testate se face cu reactiv 2,5 dinitrosalicilic. O altă metodă cunoscută de screening rapid a hidrolazelor active față de polizaharidele din biomasa vegetală implică utilizarea unor substraturi (amiloză, hidroxietilceluloză, curdlan, laminarină, amilopectină, pectină) marcate fluorescent cu clorotriazină, distribuite împreună cu supernatantele ale microorganismelor de testat în plăci de microtitrare cu 96 de godeuri filtrante (Kračun et al. 2015, *Biotechnology for biofuels*, 8, 70).

Brevetul CN 102586123 B descrie un procedeu de selecție al tulpinilor microbiene care produc cantități mari de enzime cu activitate de degradare a lignocelulozei, alcătuit din următoarele etape: (1) Realizarea unui mediu de bază

agarizat, în care este inclusă ca sursă unică de carbon hârtia de filtru măcinată; (2) Depunerea peste mediul de bază agarizat a unui al doilea mediu gelifiat cu agar, în care sursa de carbon este material lignocelulozic pre-tratat, măcinat până la 50 mesh; (3) Inocularea cu tulpini/izolate de testat; (4) Selectarea tulpinilor/izolatelor cu activitate ridicată de degradare a materialului lignocelulozic, dovedită prin creșterea viguroasă și/sau prin formarea unor halouri transparente în cele două medii agarizate.

Cererea de brevet WO2013135245 A1 prezintă un procedeu de screening de înalt randament pentru probe care includ glicozil-hidrolaze, enzime care acționează asupra polizaharidelor din materialul vegetal lignocelulozic - celuloze, hemiceluloze, pectinaze. În acest procedeu se amestecă o probă (candidat), conținând microorganisme care produc glicozil-hidrolaze (celuloze, hemiceluloze, pectinaze), cu un substrat complex de material vegetal. Apoi amestecul este incubat, pentru ca enzimele și polizaharidele / carbohidrații din materialul vegetal să interacționeze. Opțional se inactivează enzimele candidate. În final se compară compoziția de carbohidrați rezultată cu cea inițial existentă în substrat. Probele pot fi suplimentate cu inhibitori sau amplificatori cunoscuți ai activității respectivelor glicozil-hidrolaze - module de legare a carbohidraților (carbohydrate binding modules, CBMs), expansine sau „amplificatori de celulază” („cellulose enhancers”), inclusiv familia 61 de proteine produsă de *Trichoderma reesei*. Procedeu este destinat selectării tulpinilor de microorganisme producătoare de enzime utilizabile în producerea de biocombustibili de a doua generație, ca de ex. bioetanol celulozic. Determinarea compoziției în zaharide, în substratul complex de material vegetal și/sau în produșii reacției de hidroliză a acestui substrat de către glicozil-hidrolazele secretate de tulpinile de microorganisme testate, se realizează cu ajutorul unor liganzi cu specificitate de carbohidrat – de ex. anticorpi monoclonali anti-carbohidrați, lectine. Evidențierea legării acestor liganzi cu specificitate de carbohidrat, de structurile zaharidice pentru care au respectiva specificitate, se face prin utilizarea unui al doilea set de liganzi cu specificitate de legare pentru ligandul inițial (ca de ex. anticorpi monoclonali anti-liganzi cu specificitate de carbohidrat). Deși menționează faptul că invenția poate fi utilizată pentru a determina influența inhibitorilor sau amplificatorilor cunoscuți ai activității respectivelor glicozil-hidrolaze – ca de ex. heterocicli cu azot care au similaritate

structurală cu zaharidele, cu acțiune inhibitorie, sau module de legare a carbohidraților (carbohydrate binding modules, CBMs), expansine sau „amplificatori de celulază” („cellulase enhancers”), inclusiv familia 61 de proteine produsă de *Trichoderma reesei*, cu acțiune de stimulare a activității enzimatice, invenția nu exemplifică și nu revendică procedee/etape de selectare a microorganismelor care produc astfel de compuși, în special amplificatori ai acțiunii hidrolazelor care acționează asupra polizaharidelor din materialul lignocelulozic.

Cererea de brevet RO 131224 A2 se referă la un procedeu de înalt randament pentru selecția consorțiilor de microorganisme destinate tratamentului materialului vegetal, în vederea: (i) degradării lignocelulozei în componente mai simple, care pot fi procesate ulterior prin biorafinare în diferite tipuri de biochimicale; (ii) gestionării durabile a resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă; (iii) inoculării nutrețurilor însilozate pentru creșterea valorii nutritive. Procedeu implică depunerea unui film detector; adăugarea peste filmul detector a unui mediu minimal, cu material lignocelulozic pre-tratat, hidrogelificat cu un tribloc co-polimer; inocularea cu izolatele de testat; incubarea timp de 60 - 120 ore a plăcii cu prelevarea imaginii filmului detector și, respectiv, a coloniilor de microorganisme; realizarea în aceleași condiții a unei plăci martor, în care fiecare colonie din izolatele testate se dezvoltă separat, prin inocularea izolatelor pe o placă cu 96 godeuri, cu partea interioară deschisă, așezată peste filmul detector și care conține, în fiecare godeu, același mediu minimal hidrogelificat; analiza imaginilor prelevate; compararea rezultatelor din proba cu izolatele dezvoltate în interacție reciprocă în placa cu un singur godeu, cu cele din placa martor, în care fiecare izolat de testat s-a dezvoltat separat; identificarea microorganismelor care interacționează reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare, respectiv în producerea compușilor de interes din materialul lignocelulozic.

Sunt cunoscute și procedee de screening de înalt randament al tulpinilor microbiene producătoare de (per)oxidaze care acționează asupra ligninei din matricea lignocelulozică. Cererea de brevet WO2004083409 A1 revendică un procedeu de screening al unui consorțiu de bacterii lignolitice, care constă în următoarele etape: a) îmbogățirea florei bacteriene din arealul folosit pentru prelevare; b) izolarea bacteriilor lignolitice folosind diferite medii; c) cultivarea

bacteriilor izolate în diferite condiții de mediu, temperatură, pH-ul, sursa de carbon etc.; d) verificarea capacității izolatelor de degradare a ligninei prin inocularea izolatelor bacteriene în 10 ml de lignină 0,4%; e) selectarea izolatelor bacteriene care decolorează ligninei în mod eficient; f) adaptarea celor care sunt eficiente la cultivarea pe lignină g) cultivarea tulpinilor bacteriene în amestec pentru a se vedea interacțiunea/efectul lor sinergic în degradarea ligninei; h) selectarea consorțiului microbial. Prin aplicarea acestui procedeu a fost selectat consorțiul format din tulpinile de microorganisme CBTC/5203, CBTC/5303 și CBTC5403 depozitate la IMTECH, Chandigarh, India, cu numerele de acces MTCC 5094, MTCC 5095 și MTCC 5098, care au capacitate de degradare a ligninei.

Dezavantajul procedeelelor de selecție a tulpinilor/consorțiilor de tulpini microbiene descrise până în prezent este că nu sunt utilizabile pentru selectarea eficientă a consorțiilor de microorganisme care produc amestecuri de enzime / (poli)peptide amplificatoare destinate biorafinării materialului vegetal cu un conținut ridicat de fito-siliciu – ca de ex, paie de grâu, tulei de porumb, borhot, pleavă de orez, dunsturi din industria de morărit și panificație. În astfel de materiale vegetale fito-siliciul se regăsește sub două forme: (i) precipitat ca dioxid de siliciu amorf, $\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$ (Epstein 1999, *Annual Review of Plant Biology*, 50: 641-664) sau (ii) complexat în hemiceluloză (He et al. 2015. *New Phytologist*, 206: 1051-1062). Fito-siliciul, atât cel precipitat ca dioxid de siliciu, dar mai ales cel complexat în hemiceluloză, contribuie semnificativ la stabilizarea matricei lignocelulozice (Guerriero et al. 2016, *Frontiers in Plant Science*, 7, 463). De asemenea prezența fito-siliciului complică utilizarea materialului vegetal în procesele de biorafinare (Le et al. 2015, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9: 109-121). Extragerea fito-siliciului în primele faze ale biorafinării materialului vegetal ar fi în mod evident benefică pentru bio-procesarea ulterioară. Solubilizarea siliciului amorf este amplificată de acțiunea silicazei, o polipeptidă care catalizează interconversia dintre diferitele forme de dioxid de siliciu/silice, inclusiv cel amorf, și acidul silicic. Silicaza a fost identificată și în tulpini bacteriene din genurile *Methanosarcina* și *Bacillus* (Brevet SUA 8822188). Nu au fost însă publicate până în prezent procedee de selecție a microorganismelor producătoare de silicază care acționează asupra materialului lignocelulozic și nici utilizări ale silicazei pentru tratamentul materialului vegetal, în vederea facilitării degradării

ulterioare. De asemenea nu au fost publicate până în prezent nici procedee prin care să se selecteze microorganisme care eliberează siliciul complexat în hemiceluloză. În cazul acestui fito-siliciu complexat în hemiceluloză acțiunea sa de stabilizare a rețelei lignocelulozice este sinergică cu a acidului ferulic (Oliveira et al. 2015, *Plant Biotechnology Journal* 13: 1224-1232). Acidul ferulic esterifică capetele terminale ale hemicelulozelor. Hemicelulozele astfel esterificate sunt punți de legătură amfifile între polizaharidele hidrofiele (celuloză) și lignina hidrofobă. Acidul silicic complexat în hemiceluloze stabilizează suplimentar asocierea dintre polizaharidele hidrofiele și lignină, datorită prezenței concomitente a grupărilor hidroxil în molecula de acid silicic care formează legături de hidrogen cu polizaharidele hidrofiele și a orbitalilor d în atomul de siliciu care pot forma complexe coordinative cu electronii delocalizați din inelele aromatice ale compușilor fenolici / ligninei (Fleck et al. 2015, *PloS One* 10: e0138555).

Un alt dezavantaj al procedeelelor descrise până în prezent este dat de substratele utilizate. În unele procedee se folosesc substraturi purificate, ca de ex. celuloză sau lignină care nu prezintă toate particularitățile substratelor naturale, în care acțiunea celulazelor, de ex., este inhibată de hemiceluloza (Xin et al., 2016, *RSC Advances*, 6, 73859-73868) sau de lignina (Berlin et al 2006, *Journal of Biotechnology*, 125(2), 198-209) eliberate din matricea lignocelulozică. Pe de altă parte nici materialul lignocelulozic pre-tratat nu este un substrat adecvat pentru evidențierea activității hidrolazelor care acționează asupra polizaharidelor întrucât conține o serie de inhibitori / deactivatori (Kim et al. 2011, *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 408-415). De altfel, materialul lignocelulozic pre-tratat prezintă și dezavantajul prezenței unor compuși toxici pentru microorganisme (López et al. 2004. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 125-131).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu de selecție a consorțiilor de microorganisme, prin care să fie pusă în evidență rapid capacitatea respectivelor consorții de a produce amestecuri de enzime care acționează asupra materialului vegetal lignocelulozic bogat în fito-siliciu, respectiv celulaze, xilanaze, silicaze și feruloil-esteraze, ca și a (poli)peptidelor potențatoare ale acțiunii celulazelor.

„(Poli)peptidele amplificatoare ale acțiunii celulazelor” se referă la (poli)peptide cu activitate non-catalitică, care slăbesc structurile de ordin superior

ale fibrilelor de celuloză, prin desfacerea legăturilor de hidrogen, ca de ex. expansine microbiene (Georgelis et al. 2015, *Applied Microbiology and Biotechnology* 99: 3807-3823), inclusiv cerato-platanine (Bacelli, 2015, *Frontiers in Plant Science* 5: 769).

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

1. Selecția tulpinilor care cresc pe medii cu unică sursă de carbon complex de celuloză cu xilani și care produc feruloil-esterază și silicază prin cultivare pe un mediu agarizat specific cu două straturi, urmată de relevarea activității feruloil-esteraze;
2. Selecția tulpinilor care produc (poli)peptide amplificatoare ale enzimelor destinate biorafinării materialului vegetal prin identificarea expresiei secvențelor de acizi nucleici care codifică pentru respectivele tulpini;
3. Selecția consorțiilor compatibile formate din tulpini selectate în etapa 1 și 2, prin co-cultivarea acestora pe mediu mineral minimal, gelifiat cu 2% agar, care conține ca unică sursă de carbon 1% complex de celuloză cu xilani.

Aspectele preferate ale procedurii descris mai sus sunt:

- ✓ Mediul agarizat pe care se realizează selecția tulpinilor este format din două straturi: unul inferior, în grosime de 3 mm, care conține o suspensie de bioxid de siliciu amorf, în concentrație de 1% și este gelifiat cu agar 2%; un strat superior cu mediu minimal mineral, în grosime de 7 mm, gelifiat cu 2,5% agar, care conține o suspensie de 1% complex de celuloză cu xilani.
- ✓ Selecția tulpinilor se face prin identificarea celor care cresc abundent pe mediu minimal și care produc un halou clar în stratul inferior care conține bioxid de siliciu amorf;
- ✓ Relevarea activității feruloil-esterazei se face prin: depunerea peste plăcile în care s-a realizat selecția tulpinilor care cresc pe medii cu unică sursă de carbon celuloză complexată cu xilani și care produc silicază, a unui strat de 3 mm mediu agarizat cu 3% agar, care conține 0,2% ferulat de etil, incubarea timp de 6 ore la temperatura camerei și evidențierea halourilor clare în jurul coloniilor producătoare de feruloil-esterază;
- ✓ Identificarea tulpinilor care produc (poli)peptide potențatoare ale enzimelor destinate biorafinării materialului vegetal se face prin detectarea specifică a expresiei genelor care codifică pentru respectivele (poli)peptide, prin cuantificarea

în timp real a transcrierii respectivelor gene („Quantitative Reverse Transcription PCR”);

✓ Selecția consorțiilor compatibile formate din tulpini selectate se realizează printr-un procedeu de înalt randament, prin compararea dezvoltării coloniilor cultivate separat pe o placă cu 96 de godeuri, cu mediu mineral minimal, gelificat cu 2% agar, care conține ca unică sursă de carbon 1% complex de celuloză cu xilani, și a coloniilor co-cultivate în matrice de 96 de colonii, rezultate din 12 colonii distribuite randomizat în 8 repetiții pe același mediu mineral minimal;

Prezenta invenție are următoarele avantaje:

✓ Favorizează dezvoltarea microorganismelor producătoare de enzime (hemi)celulozolitice datorită utilizării unui substrat complex de celuloză cu xilani, care nu conține compuși toxici pentru microorganisme;

✓ Permite selectarea unor consorții microbiene compatibile care produc amestecuri de enzime cu acțiune complementară asupra materialului vegetal cu un conținut ridicat de siliciu, respectiv celuloze, xilanaze, silicaze și feruloil-esteraze;

✓ Include în cadrul consorțiilor microbiene compatibile tulpini care produc (poli)peptidelor potențatoare ale acțiunii celulozelor, selectate prin tehnici care permit detectarea specifică a expresiei genelor care codifică pentru respectivele (poli)peptide.

În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

Exemplul 1. Se prepară un mediu care conține o suspensie de silica gel 60 (0.015-0.040 mm, dioxid de siliciu amorf, CAS No. 7631-86-9, Merck Millipore, Darmstad, Germania) în concentrație de 1% și care este gelificat cu agar 2%. Mediul se autoclavează 15 min la 121°C și apoi se răcește. Se adaugă aseptice 18ml din acest mediu pe o placă Petri ϕ 9 cm (suprafață $\sim 60 \text{ cm}^2$), pentru a obține un strat de 3 mm grosime care conține o suspensie de bioxid de siliciu amorf.

Se prepară un mediu minimal care conține la 1 Litru: Na_2HPO_4 (anhidru) 6 g; KH_2PO_4 3 g; NaCl 0.5 g; NH_4Cl 1 g, 10 g complex de celuloză cu xilani ca unică sursă de carbon și nouă microelemente, în următoarele concentrații finale: MgSO_4 1 mM; CaCl_2 0,1 mM; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3×10^{-9} M; H_3BO_3 4×10^{-7} M; CoCl_2 . 6



H_2O 3×10^{-8} M; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1×10^{-8} M; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8×10^{-8} M; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1×10^{-8} M; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1×10^{-6} M (Reactivi proveniți de la Merck Millipore, Darmstadt).

Complexul de celuloză cu xilani folosit mai sus se prepară după următoarea rețetă: 10 g de celuloză microcristalină (Avicel® PH, FMC Health and Nutrition, Philadelphia, PA) și 0,75 g de xilan (750 mg) se suspendă în 1000 ml tampon citrat cu tărie ionică de 1 mol/L (preparat prin adăugare a 50,73 g de NaCl la 1000 ml tampon citrat 50 mM pH 5,0). Se menține la temperatura de 50°C timp de 6 ore, pe agitator orbital (200 rpm). Se centrifughează 10 min la 10.000xg. Sedimentul, complex celuloză microcristalină cu xilan, se usucă la vid la 105°C, timp de 4 ore. Pulberea uscată rezultată se utilizează ca unică sursă de carbon în mediul de cultură minimal.

Se realizează mai întâi mediul cu principalele săruri și complex de celuloză cu xilani, apoi se aduce pH la 7,4 cu NaOH. Mediul minimal se gelifiează cu agar, 25 g/l. Mediul gelifiat se sterilizează prin autoclavare 20 min la 121°C și apoi se adaugă micro-elementele, prin diluarea unor soluții stoc sterilizate prin ultrafiltrare, adăugate în volumele necesare pentru atingerea concentrației finale în mediul de cultură.

Se adaugă 42 ml din mediul minimal cu complex celuloză – xilani peste stratul gelifiat care conține bioxid de siliciu amorf pentru a avea un strat de 7 mm din mediu gelifiat cu 2,5% agar și care conține o suspensie de 1% complex de celuloză cu xilani. Mediul se inoculează cu izolatele microbiene de testat. Se incubează la temperatura de 28°C, timp de 3 zile. După 3 zile se identifică la stereomicroscop tulpinile care cresc abundent pe mediu minimal și care produc un halou clar în stratul inferior care conține bioxid de siliciu amorf.

Se revelează activitatea feruoil-esterazei. Aceasta se face prin: depunerea peste plăcile în care s-a realizat selecția tulpinilor care cresc pe medii cu unică sursă de carbon celuloză complexată cu xilani și care produc silicază a 18 ml de soluție agarizată cu 3% agar, care conține 0,2% ferulat de etil, etil 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilat, pentru a realiza un strat de 3 mm mediu agarizat. Se incubează timp de 6 ore la temperatura camerei și se evidențiază prezența halourilor clare în jurul coloniilor producătoare de feruoil-esterază.

În paralel se desfășoară un experiment de selecție a tulpinilor care produc (poli)peptide amplificatoare ale enzimelor destinate biorafinării materialului

vegetal, prin identificarea exprimării secvențelor de acizi nucleici care codifică pentru respectivele tulpini.

Tulpinile de microorganisme analizate se cultivă pe medii lichide conținând 1% glucoză și 0,05% peptonă. Mediile sunt inoculate cu 1×10^6 propagule (conidii ale fungilor presupuși producători de polipeptide amplificatoare ale enzimelor destinate biorafinării materialului vegetal) per ml și se cultivă timp de 3 zile, pe agitator incubat, la 28°C și 200 rpm. Se recoltează biomasa și se îngheață în azot lichid. Probele de biomasă înghețată se macină fin, iar din pulberea de biomasă se extrage ARN total cu reactiv TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, SUA), conform instrucțiunilor producătorului. Pentru purificarea ARN probele se tratează cu DN-ază I liberă de RN-ază (Fermentas, Thermo Fisher Scientific – Antisel, București, Romania), conform protocolului producătorului.

Evidențierea exprimării genelor care codifică pentru (poli)peptide amplificatoare ale enzimelor destinate biorafinării materialului vegetal se face prin cuantificarea transcrierii genelor respective prin amplificarea enzimatică în timp real a ADN rezultat prin revers transcrierea ARNm corespunzător respectivelor gene, cu utilizarea unor secvențe de primeri specifice pentru genele *ep1* („eliciting plant response-like”) sau *sm1* („small protein 1”). Respectivetele gene codifică polipeptide din familia cerato-plataninelor care acționează asupra legăturilor fizice (de hidrogen, dipol-dipol, π - π , Van de Waals).

O cantitate de 2 μ g de ARN total tratat cu DN-ază este supus revers-transcrierii la ADNc cu SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), folosind oligo-dT primeri. ADNc sintetizat este cuantificat cu un spectrofotometru Nanodrop (Thermo Scientific) și folosit ca matriță pentru amplificarea enzimatică în timp real (real time RT-PCR). Primerii folosiți sunt cei descriși de Djonovic et al. 2006, *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 838-853, pentru *sm1* și de Seidl et al. 2006, *FEBS Journal* 273, 4346-4359 pentru *ep1*. Orice alți primeri descriși în literatură se pot utiliza pentru a detecta exprimarea (poli)peptidelor care amplifică activitatea enzimelor implicate în destructurarea matricei lignocelulozice datorită efectelor de slăbire a legăturilor fizice care stabilizează respectiva matrice proteică. Datele de exprimare sunt evaluate cu ajutorul unui software specializat, ca de ex. REST (Pfaffl et al. 2002, *Nucleic Acids Research*, 30, e36). Orice alt soft similar se poate utiliza.

Se selectează consoțiile compatibile din tulpinile selectate în etapele anterioare care produc celulaze, xilanaze, silicaze și feruloil-esteraze și/sau (poli)peptide amplificatoare ale acțiunii celulazelor, printr-un procedeu de înalt randament.

În cadrul acestei etape se compară dezvoltarea coloniilor cultivate separat pe o placă cu 96 de godeuri, cu mediu mineral minimal, gelificat cu 2% agar, care conține ca unică sursă de carbon 1% complex de celuloză cu xilani și a coloniilor co-cultivate în matrice de 96 de colonii, rezultate din 12 tulpini microbiene distribuite randomizat în 8 repetiții pe același mediu mineral minimal.

Într-o placă Cellstar® OneWell Plate™ (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania) se adaugă aseptice 63,2 ml de mediul minimal – complex de celuloză cu xilani - agar, lichefiat la 48°C, pentru a forma un strat de mediu de cultură cu grosime de 8 mm. Mediul se lasă la temperatura camerei în condiții aseptice pentru a se răci și solidifica. Acest strat de mediu de cultură agarizat se inoculează, axenic, cu 12 tulpini/izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții. Inocularea se realizează cu mici cantități de inocul lichid, prelevat cu ajutorul unui replicator de inox cu 96 pini (Multi -Blot™ Replicator System, V&P Scientific, San Diego, CA, SUA), dintr-o placă cu 96 de godeuri în care s-a realizat axenic în mediu lichid diluarea și randomizarea tulpinilor/izolatelor de testat, conform celor descrise în continuare. Într-o placă cu 96 de godeuri se distribuie aseptice tampon fosfat salin steril, câte 225 μl în fiecare godeu. Culturile re-împrospătate din tulpinile de testat, realizate în mediu lichid specific prin cultivare timp de 24-48 ore (în funcție de tipul de microorganism utilizat în experimente), se normalizează prin diluție la 10⁷ ufc/ml. Din aceste culturi se preiau 25 μl care se aduc axenic peste cei 225 μl tampon fosfat salin steril, conform unei schemei de randomizare care este prezentată în tab. 1 de mai jos.

Tab.1. Schema de randomizare a celor 12 tulpini în 8 repetiții aplicată pentru placa cu 96 godeuri.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6	11	2	7	12	3	8	9	4	5	10	1
B	12	3	7	9	4	8	10	1	5	11	2	6
C	4	8	9	1	5	10	2	6	11	3	7	12
D	8	12	1	5	11	4	6	10	3	7	9	2
E	11	4	5	10	3	6	9	2	7	12	1	8
F	3	6	10	2	7	9	1	8	12	4	5	11
G	7	10	4	6	9	1	5	12	2	8	11	3
H	9	1	6	12	2	5	11	3	8	10	4	7

Replicatorul de inox se sterilizează prin flambare, se răcește și apoi se scufundă în placa de 96 godeuri în care s-a realizat axenic în mediu lichid diluarea și randomizarea tulpinilor / izolatelor de testat. Pe fiecare pin se preiau câte 10-20 μ l de inocul lichid, cu 10^6 ufc/ml, datorită aderenței lichidului la suprafața metalului. Această mică cantitate de inocul este transferată pe stratul superior de mediu de cultură agarizat, prin presarea ușoară a replicatorului cu 96 pini pe suprafața respectivului mediu de cultură.

Placa inoculată se incubează timp de 60 - 120 ore, la temperatura de 30°C. Din 12 în 12 ore se preiau imaginile coloniilor de microorganisme, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare (G-Box Chemi XRQ, Syngene, Cambridge, Marea Britanie).

În paralel se realizează o placă martor, în care fiecare colonie din izolatele / tulpinile microbiene testate se dezvoltă separat. Pe o placă de microtitrare cu 96 godeuri cu fund plat (Corning® Costar® cell culture plates, Corning, NY, SUA), se distribuie câte 325 μ l de mediu minimal – complex de celuloză cu xilani - agar, la temperatura de 50°C, pentru a forma un strat cu grosime de 8 mm. Cele 12 tulpini/izolate distribuite randomizat în 8 repetiții conform tab.1 se inoculează cu ajutorul unui replicator cu 96 pini, care a fost în prealabil sterilizat prin flambare.

Plăcile martor cu 96 de godeuri în care microorganismele inoculate se dezvoltă individual, fără a interacționa, se incubează timp de 60 - 120 ore, la aceeași temperatură ca și plăcile cu un singur godeu în care microorganismele interacționează. Din 12 în 12 ore se preiau imaginile coloniilor de microorganisme dezvoltate în fiecare godeu, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare (G-Box Chemi XRQ, Syngene).

Exemplul 2. Se lucrează ca în exemplu 1, cu următoare diferență: în etapa de identificare și selectare a microorganismelor producătoare de amplificatori ai acțiunii hidrolazelor asupra materialului vegetal se folosesc primeri specifici pentru gena Yoaj – Expansin (*EXLX1*), cum sunt cei descriși de Cervantes et al. 2016, *Journal of Animal Science* 94, S5, 791-791, sau *Cms* (cellulose microfibril swelling enzyme) descriși de Haque et al. 2015, *Process Biochemistry*, 50, 807-815.

REVENDICĂRI

1. Procedeu de selecție al consorțiilor de microorganisme destinate biorafinării materialului vegetal cu conținut ridicat de fito-siliciu **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: selecția tulpinilor care cresc pe medii cu unică sursă de carbon complex de celuloză cu xilani și care produc feruloil-esterază și silicază, prin cultivare pe un mediu agarizat specific cu două straturi, urmată de relevarea activității feruloil-esteraze; selecția tulpinilor care produc (poli)peptide amplificatoare ale enzimelor destinate biorafinării materialului vegetal, prin cuantificarea expresiei secvențelor de acizi nucleici care codifică pentru respectivele peptide; selecția consorțiilor compatibile formate din tulpini selectate în etapa 1 și 2, prin co-cultivarea acestora pe mediu mineral minimal, gelifiat cu 2% agar, care conține ca unică sursă de carbon 1% complex de celuloză cu xilani.
2. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** mediul agarizat pe care se realizează selecția tulpinilor este format din două straturi, unul inferior, în grosime de 3 mm, care conține o suspensie de bioxid de siliciu amorf, în concentrație de 1% și este gelifiat cu agar 2%, și un strat superior cu mediu mineral minimal, în grosime de 7 mm, gelifiat cu 2,5% agar, care conține o suspensie de 1% complex de celuloză cu xilani.
3. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** selecția tulpinilor se face prin identificarea celor care cresc abundent pe mediu minimal și care produc un halou clar în stratul inferior care conține bioxid de siliciu amorf.
4. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** relevarea activității feruloil-esterazei se face prin depunerea peste plăcile în care s-a realizat selecția tulpinilor care cresc pe medii cu unică sursă de carbon celuloză complexată cu xilani și care produc silicază, a unui strat de 3 mm mediu agarizat cu 3% agar, care conține 0,2% ferulat de etil, incubarea timp de 6 ore la temperatura camerei și evidențierea halourilor clare în jurul coloniilor producătoare de feruloil-esterază.
5. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** identificarea tulpinilor care produc (poli)peptide potențatoare ale enzimelor destinate

biorafinării materialului vegetal se face prin detectarea specifică a expresiei genelor care codifică pentru respectivele (poli)peptide, prin amplificarea enzimatică în timp real a ADNc rezultat prin reverstranscrierea ARNm corespunzător respectivelor gene.

6. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea** că selecția consorțiilor compatibile formate din tulpini selectate se realizează printr-un procedeu de înalt randament, prin compararea dezvoltării coloniilor cultivate separat pe o placă cu 96 de godeuri, cu mediu mineral minimal, gelifiat cu 2% agar, care conține ca unică sursă de carbon 1% complex de celuloză cu xilani și a coloniilor co-cultivate în matrice de 96 de colonii, rezultate din 12 colonii distribuite randomizat în 8 repetiții pe același mediu mineral minimal.