

**Decizie de indexare a faptei de plagiat la poziția
00075 / 06.02.2014
și pentru admitere la publicare în volum tipărit**

care se bazează pe:

A. Nota de constatare și confirmare a indicilor de plagiat prin fișa suspiciunii inclusă în decizie.

Fișa suspiciunii de plagiat / Sheet of plagiarism's suspicion	
Opera suspicionată (OS)	Opera autentică (OA)
Suspicious work	
OS	JURCOANE, S. <i>Biotehnologii – Fundamente, Bioreactoare. Enzime</i> . București: Ed.Tehnică. 2000.
OA	ZĂRNEA, G. MENCINICOPSCHI, G. și BRĂGAREA, S. <i>Bioingineria preparatelor enzimaticе microbiene</i> . București: Ed. Tehnică. 1980
Incidența minimă a suspiciunii / Minimum incidence of suspicion	
p.93	p.102 – p.103
p.82 - p.84	p.118- p.121
p.96	p.122 – p.123
p.86	p.138 – p.139
p.90-91	p.173, p.176
p.92	p.185
p.87-p.88	p.195-196
p.156 - p.159	p.201 - p.205
p.264	p.221
p.294	p.250
p.298 – p.299	p.252 - p.254
p.309	p.325
Fișa întocmită pentru includerea suspiciunii în Indexul Operelor Plagiate în România de la Sheet drawn up for including the suspicion in the Index of Plagiarized Works in Romania at www.plagiate.ro	

Notă: Prin „p.72:00” se înțelege paragraful care se termină la finele pag.72. Notația „p.00:00” semnifică până la ultima pagină a capitolului curent, în întregime de la punctul inițial al preluării.

Note: By „p.72:00” one understands the text ending with the end of the page 72. By „p.00:00” one understands the taking over from the initial point till the last page of the current chapter, entirely.

B. Fișa de argumentare a calificării de plagiat alăturată, fișă care la rândul său este parte a deciziei.

Fișa de argumentare a calificării

Nr. crt.	Descrierea situației care este încadrată drept plagiat	Se confirmă
1.	Preluarea identică a unor pasaje (piese de creație de tip text) dintr-o operă autentică publicată, fără precizarea întinderii și menționarea provenienței și însușirea acestora într-o lucrare ulterioară celei autentice.	<input checked="" type="checkbox"/>
2.	Preluarea a unor pasaje (piese de creație de tip text) dintr-o operă autentică publicată, care sunt rezumate ale unor opere anterioare operei autentice, fără precizarea întinderii și menționarea provenienței și însușirea acestora într-o lucrare ulterioară celei autentice.	
3.	Preluarea identică a unor figuri (piese de creație de tip grafic) dintr-o operă autentică publicată, fără menționarea provenienței și însușirea acestora într-o lucrare ulterioară celei autentice.	
4.	Preluarea identică a unor tabele (piese de creație de tip structură de informație) dintr-o operă autentică publicată, fără menționarea provenienței și însușirea acestora într-o lucrare ulterioară celei autentice.	
5.	Republicarea unei opere anterioare publicate, prin includerea unui nou autor sau de noi autori fără contribuție explicită în lista de autori	
6.	Republicarea unei opere anterioare publicate, prin excluderea unui autor sau a unor autori din lista inițială de autori.	
7.	Preluarea identică de pasaje (piese de creație) dintr-o operă autentică publicată, fără precizarea întinderii și menționarea provenienței, fără nici o intervenție personală care să justifice exemplificarea sau critica prin aportul creator al autorului care preia și însușirea acestora într-o lucrare ulterioară celei autentice.	<input checked="" type="checkbox"/>
8.	Preluarea identică de figuri sau reprezentări grafice (piese de creație de tip grafic) dintr-o operă autentică publicată, fără menționarea provenienței, fără nici o intervenție care să justifice exemplificarea sau critica prin aportul creator al autorului care preia și însușirea acestora într-o lucrare ulterioară celei autentice.	
9.	Preluarea identică de tabele (piese de creație de tip structură de informație) dintr-o operă autentică publicată, fără menționarea provenienței, fără nici o intervenție care să justifice exemplificarea sau critica prin aportul creator al autorului care preia și însușirea acestora într-o lucrare ulterioară celei autentice.	
10.	Preluarea identică a unor fragmente de demonstrație sau de deducere a unor relații matematice care nu se justifică în regăsirea unei relații matematice finale necesare aplicării efective dintr-o operă autentică publicată, fără menționarea provenienței, fără nici o intervenție care să justifice exemplificarea sau critica prin aportul creator al autorului care preia și însușirea acestora într-o lucrare ulterioară celei autentice.	
11.	Preluarea identică a textului (piese de creație de tip text) unei lucrări publicate anterior sau simultan, cu același titlu sau cu titlu similar, de un același autor / un același grup de autori în publicații sau edituri diferite.	
12.	Preluarea identică de pasaje (piese de creație de tip text) ale unui cuvânt înainte sau ale unei prefete care se referă la două opere, diferite, publicate în două momente diferite de timp.	

Notă:

a) Prin „proveniență” se înțelege informația din care se pot identifica cel puțin numele autorului / autorilor, titlul operei, anul apariției.

b) Plagiatul este definit prin textul legii¹.

„...plagiatul – expunerea într-o operă scrisă sau o comunicare orală, inclusiv în format electronic, a unor texte, idei, demonstrații, date, ipoteze, teorii, rezultate ori metode științifice extrase din opere scrise, inclusiv în format electronic, ale altor autori, fără a menționa acest lucru și fără a face trimisă la operele originale...”

Tehnic, plagiatul are la bază conceptul de **piesă de creație** care²:

„...este un element de comunicare prezentat în formă scrisă, ca text, imagine sau combinat, care posedă un subiect, o organizare sau o construcție logică și de argumentare care presupune niște premise, un raționament și o concluzie. Piesă de creație presupune în mod necesar o formă de exprimare specifică unei persoane. Piesă de creație se poate asocia cu întreaga operă autentică sau cu o parte a acesteia...”

cu care se poate face identificarea operei plagiate sau suspicionate de plagiat³:

„...O operă de creație se găsește în poziția de operă plagiată sau operă suspicionată de plagiat în raport cu o altă operă considerată autentică dacă:

- i) Cele două opere tratează același subiect sau subiecte înrudite.
- ii) Opera autentică a fost făcută publică anterior operei suspicionate.
- iii) Cele două opere conțin piese de creație identificabile comune care posedă, fiecare în parte, un subiect și o formă de prezentare bine definită.
- iv) Pentru piesele de creație comune, adică prezente în opera autentică și în opera suspicionată, nu există o menționare explicită a provenienței. Menționarea provenienței se face printr-o citare care permite identificarea piesei de creație preluate din opera autentică.
- v) Simpla menționare a titlului unei opere autentice într-un capitol de bibliografie sau similar acestuia fără delimitarea întinderii prelăuirii nu este de natură să evite punerea în discuție a suspiciunii de plagiat.
- vi) Piese de creație preluate din opera autentică se utilizează la construcții realizate prin juxtapunere fără ca acestea să fie tratate de autorul operei suspicionate prin poziția sa explicită.
- vii) În opera suspicionată se identifică un fir sau mai multe fire logice de argumentare și tratare care leagă aceleași premise cu aceleași concluzii ca în opera autentică...”

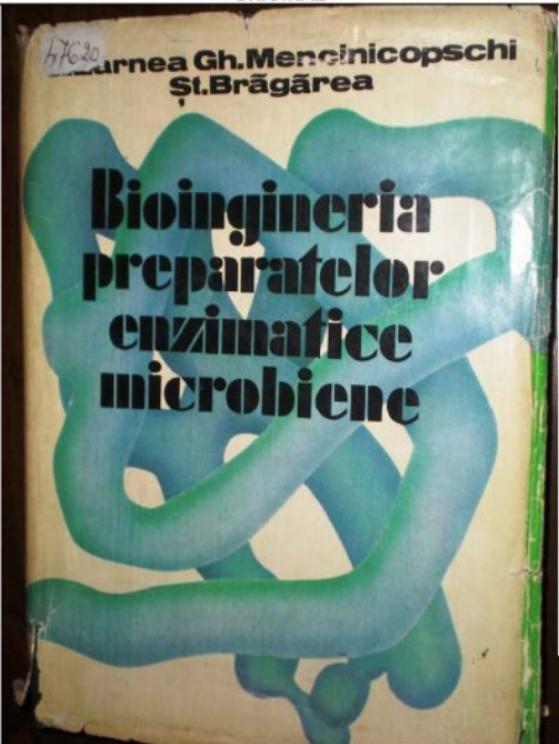
¹ Legea nr. 206/2004 privind buna conduită în cercetarea științifică, dezvoltarea tehnologică și inovare, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 505 din 4 iunie 2004

² ISOC, D. *Ghid de acțiune împotriva plagiatului: bună-conducță, preventire, combatere*. Cluj-Napoca: Ecou Transilvan, 2012.

³ ISOC, D. *Prevenitor de plagiat*. Cluj-Napoca: Ecou Transilvan, 2014.

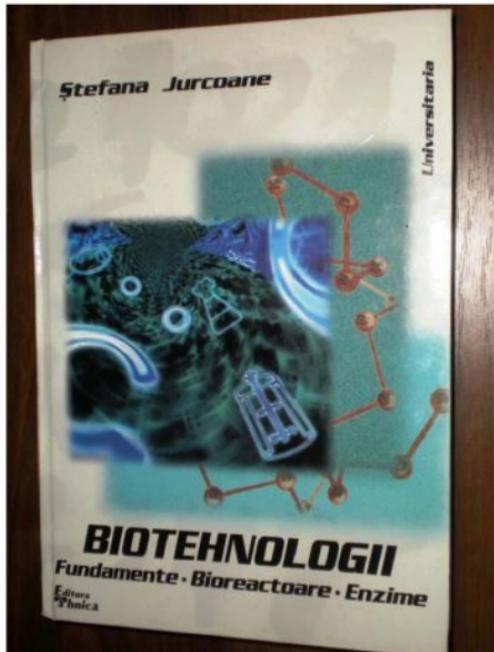
Zarnea, G., Mencinicopschi, Gh., Bragarea, St., Bioingineria preparatelor enzimatiche microbiene, Ed. Tehnica, Bucuresti, 1980

ORIGINAL



Jurcoane Stefana, Biotehnologii – Fundamente, Bioreactoare, Enzime, Ed. Tehnica Bucuresti, 2000

COPIE



3. Biosinteză industrială a enzimelor

În ultima vreme obținerea directă a metabolitilor și utilizarea capacitaților biocatalitice ale microorganismelor susțină cu prioritate între specialiști doar din lume o mare importanță economică.

Produse ca preparate enzimatice, antibiotic, vitamine, aminoațizi, acizi organici, etanol, proteine, minerații (S.C.P. – P.O.P.) se obțin prin strânsa colaborare dintre microbiologie-biochimie cu ingineria chimică, tehnologia și construcția de apărare. Necesitatea aplicării metodelor microbiologice la nivel industrial poate fabrica și să producă substanțele menționate a condus la apariția unui nou domeniu, desosat de dinamic, acela al bioinginieriei și biotecnologiei.

Biotecnologia producerii preparațiilor enzimatice se bazează pe principiul cultivării microorganismelor în instalații industriale speciale, asigurându-se producătorului condiții optime de creștere, dezvoltare și biosinteză a metabolitului dorit.

Formarea producătorilor metabolici este corelată cu anumite faze de dezvoltare a microorganismelor. Se impune deci necesitatea conducerii și reglării proceselor selectiv și anumitor căi metabolic pentru acumularea prezentării clăse, număr și concentrație biologic să necesite mai multă apărare de măsură și control.

3.1. Etapele elaborării tehnologiilor de biosinteză a enzimelor

Elaborarea și industrializarea tehnologiilor de biosinteză a enzimelor se realizează parțial sau în serie de faze necădere constând în cercetări la nivel de laborator, stație pilot, stație industrială experimentală, unitate industrială de producție. În cadrul sectorului faza se deschidese mai multe trepte de transpunere a biotecnologiei la producție (fig. 3.1.).

5 ETAPELE UNUI PROCES BIOTEHNOLÓGIC

Elaborarea și industrializarea unei tehnologii de biosinteză presupune parcursul mai multor faze constând în cercetări la nivel de: laborator, pilot și industrial. Aceste cercetări permit transpunerea procedeului de biosinteză de la o fază la alta.

5.1. FAZA DE LABORATOR

Cercetările de obținere a unui produs prin biosinteză încep cu lucrări de laborator care sunt prezente în cele ce urmează.

Isolarea și selecția. Se izolează și se selectează un mare număr de microorganisme cunoscute din literatura de specialitate ca producători ai microorganismelor care urmărează a fi bioîntăzită. Tehniciile utilizate în acest scop sunt specifice pentru fiecare microorganism și sunt realizate de microbiologi cu pregătire corespunzătoare. Manualele de specialitate indică mai frecvent, pentru izolare și selecție microorganismelor, metode ca: tehnica diluțiilor și tehnica granulelor de sol.

Microorganismele sunt preluate din diferite habitate cultivate pe mediu solide sau lichide, astfel încât să fie posibilă punerea în evidență a unor caracteristici fiziológice. În prima etapă se urmărește realizarea unei culturi pure prin tehnici microbiologice specifice (epuizarea anse, diluții successive etc.). În continuare se stabilește o metodă de trimitere (screening) adecvată scopului urmărit.

De obicei, microorganismele sunt cultivate pe plăci Petri, pe mediu solidificate cu agar-agar. Tehnici de identificare a compusului care interesează pot fi calitative sau quantitative. În ceea ce privește enzimelor, de exemplu, se aplică, de obicei, metode de identificare calitativă prin incluzarea în mediul solid, pe care se cultiva

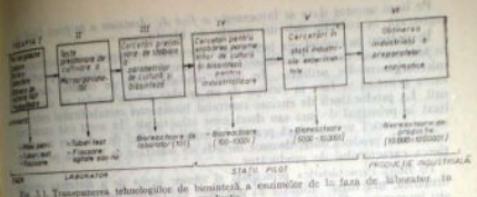


Fig. 3.1. Transparența tehnologică de biotehnici a enzimelor de la fază de laborator la producție

3.3.1. Faza de laborator

Procesul de bază din tehnologia de biosințeză a enzimelor este foarte diversificat.

Cercetările încep prin izolare din diferite habitate a unui mare număr de microorganisme cunoscuți sau presupuse a elabora enzimele dorite. Tehnici de izolare și purificare a culturilor de microorganisme sunt cele descrise în manualele de specialitate, mai frecvent utilizate fiind: tehnica diluțiilor, tehnica granulelor de sol. Deși se crează condiții selective de cultură a microorganismelor pe mediu solidă sau lichidă, conținând anumite principii ce ajută celor cibernetice să pot evidenția unele caracteristici biochimice. După etapa de izolare și realizare a culturii și purificare tehnică directă ale microorganismelor sau indirecte (centrifugă, centrifugă diluții etc.), se trece la tritarea (homogenizare) tulipinelor luate în horu după criterii calitative și cantitative, codificate în tehnologia de bază. Dacă teste calitative pentru izolare tulipinelor mai produtive pentru alfaamylază se utilizează metoda amiloblastică, pentru izolare productorilor de proteaze metoda Fraizer etc. Principial acestor teste calitative constă în cultivarea microorganismelor în plăci Petri pe mediu solidificate în agar-agar, conținând sustrate naturale ale enzimelor dorite. După dezvoltarea coloniilor izolate, enzimele difuzăază în gelul de agar-agar atârnând substratul inclus în mediu. Interpretarea rezultatelor se face după adăugarea unui reactiv specific substratului (amidon-Lugol cu iodin-reactiv TCA, Fraizer) prin apariția unei zone de hidroliză în jurul coloniilor, și că această zonă este mai extinsă cu atât microorganismul este mai bun producător.

Totdeauna cantitative se efectuează prin determinarea precisi a activității enzimatici, extractele sau lichidele de biosințeză prin metode spectrometrie, de fluorescență, titrimetrice, polarimetrice, manometrice.

În urma acestor teste se rețin numai cibernetii tulipini care sunt apoi cercetate în vederea identificării și caracterizării după criterii morfologice, biocimice, fiziolegice, imunolegice, virulență-patogenitate, sensibilitate la fagi, tehnologie etc.

genetic. Pe altă parte, procesul de cretere depinde în evoluția sa de natura și concentrația substantelor nutritive din mediul și de aprovisionarea continuă a celulei cu energie și reacțiile catabolice de sinteză.

Creșterea bacteriei se realizează prin dezvoltarea uni- sau tridimensională de substanțe nutritive, ceea ce determină mărirea celulei bacteriene în sensul uneia din trei dimensiuni și sau în sensul tuturor celor trei dimensiuni.

Mărirea volumului celular se face la bacterii nu numai prin sinteza de substanță organică, ci și prin sporescă conservativă accentuată a conținutului lor de apă. Astfel la *Pseudomonas vulgaris*, una crește în volum de cinci ori, îl corespunde o cretere în substanță organică de numai două ori.

Creșterea microorganismelor are loc indefinitely, ci se întârziează la un moment dat, cind se produce diviziunea celulei. Diferite ipoteze au incercat să explice căderea creșterii din cauza unor factori intrinseci, controlați genetic sau prin aceea că se determină de epoxidarea substanțelor nutritive din mediul în care se acumulează în el o rată catabolită toxică, ipoteză confirmată de observația că în același cultură coexistă orale de vîrstă diferite (tineri, adulte, pe cale de diviziune, bătrâni etc.).

Se admite astăzi că activitatea normală a microorganismelor este condiționată de existența unei anumite raporte între volumul celulei, care consumă și absorbe substanțe nutritive, și ceea ce face absolvita substanțelor nutritive și eliminarea catabolitilor. În cadrul creșterii bacteriene, raportul suprafață/volum se modifică dintrori faptul că în timp ce suprafața crește cu o rată pătratică, volumul ei se mărește după o rată cubică, ceea ce determină o diminuare relativă a suprafeței celulare. Aportul de material nutritiv din mediul devine astfel din ce în ce mai puțin suficient pentru metabolismul bacterien. Pe de altă parte, pe măsură ce creșterea celulare se mărește, echilibrul ei biochimic se schimbă: concentrația unei compozante scade în timp ce altăii se acumulează. Întrucât circulația substanțelor prin celule se face în ambele sensuri — spre interior și spre exterior — și următoarele sunt cele mai importante puncte critice, raportul lor adecvat se stabilește prin diviziunea celulei ajunând la limita ei de creștere. În felul acesta, creșterea celulei este parțială, însă o formă necesară de reglare a creșterii celulei microscopice.

In cadrul proceselor biotecnologice studiul creșterii și multiplicării micro-organismelor produselor are o importanță practică deosebită pentru rezultata și eficiența tehnologice industriale.

Spre deosebire de organismele pluricelulare, la care multiplicarea celulelor dă ca rezultat creșterea numărului de indivizi. Multiplicarea celulelor bacteriene (prokaryote) se realizează pe două cai, dintre care una *distribuție simplă*, deoarece ea poate fi practic generală, iar realitatea, *simpatogenă sau cavităță*, este exemplificată, într-o caracteristică, de *Escherichia coli*, care este foarte rar de simbianță. Multiplicarea a numărului unui număr relativ scăzut de bacterii atinge cînd celula se află în condiții optime de viață, constă în scindarea unei singure celule în două celule noi, care pot fi aproximativ egale (diviziune longitudinală sau oblique - divisione heteromorfă).

Diviziunea bacterienei în fază *S* se realizează prin strangulare, în timp ce din noua pără fragmentelor, este caracteristica bacteriilor aflată în fază *R*.

III

4. CINETICA PROCESELOR DE BIOSINTEZĂ

4.1. DINAMICA MULTIPLICĂRII BACTERIILOR. CURBA DE CREȘTERE

Procesul de creștere a microorganismelor se desfășoară prin sinteza specifică echilibrată a constituenților celulaři, pornind de la substanțe nutritive simple situate în mediul de cultură (Gh. Zamfir).

Procesul de creștere a microorganismelor este controlat genetic. Pe altă parte, acesta depinde în evoluția sa și de natura și concentrația substanțelor nutritive în mediu, precum și de asigurarea cu energie necesară reacțiilor de sinteză. Creșterea bacteriilor se realizează prin dezvoltarea uni- sau tridimensională de substanță nouă, ceea ce determină mărirea celulei bacteriene în sensul uneia din trei dimensiuni și sau în sensul celor trei dimensiuni. Mărirea volumului cellular se face atât prin sinteza de substanță organică cât și prin mărirea conținutului în apă. Creșterea microorganismelor nu are loc indefinitely, ci se întârziează la un moment dat, cind se produce diviziunea celulară.

Activitatea normală a microorganismelor este condiționată de existența unei anumite raporte între volumul celulei și suprafața ei, prin care se face absorția substanțelor nutritive și eliminarea catabolitilor. În cursul creșterii celulei, raportul suprafață/volum se modifică dintrori faptul că, în timp ce suprafața crește cu o rată pătratică, volumul ei se modifică cu o rată cubică, ceea ce determină o diminuare relativă a suprafeței celulare fapt ce îngrenewază schimbul de substanțe și, în final, cind discrepanța dintre suprafață și volum atinge un anumit punct critic, se produce diviziunea celulei.

In cadrul proceselor biotecnologice, studiul creșterii și multiplicării micro-organismelor produselor are o importanță deosebită pentru eficiența tehnologilor industriale. Spre deosebire de organismele pluricelulare, la care multiplicarea se realizează doar la mărirea tutăi individuale, la mărealație organismelor unicelulare, rezultatul creșterii numărului de indivizi, Viteza de multiplicare a

ura,
val.
alii
eta

ubli-
lor
res-
ent
lice
sau
dru-
chii
de

pro-
pi-
rea
ich
nul
la
dile
ari-
en-
gia
—
tre
se
ful
are
ro-
su-
in-
re,
lor
tot
au
re-
ic-
ts,
iv
ce
R.

Viteza de multiplicare a bacteriilor este excepțional de mare. Durata unei generații — intervalul de timp dintre două diviziuni consecutive — este tipică pentru fiecare specie, dar poate varia în funcție de condițiile de creștere și de mediu, fiind în general cuprinsă în limitele a 20...30 de minute. Numărul celorlăți apreciați capabilități de creștere și multiplicare a bacteriori prin „durată a generației” definită ca intervalul de timp necesar pentru dublarea numărului celulelor.

Actinomycete, bacterii *gram-positive* transitoriu sau constant filamentoase și ramificate, deosebit de războinică, se multiplică prin diviziune directă. Specii spongogene de actinomice formează patru tipuri de spori: oidiospori, condili, sporangiospori și chlamidiospori.

Lorulae sau *deuteliae*, taxon unicificat în filumul *Endomycetes* (fungi adezivări) se prezintă în mod obișnuit și dominant în formă unicelulară și cu un nucleu internă de tip encariet. Ele se înmulțesc în mod obișnuit asupra priu înimicului și occasionă prădări divizionale sau prin procese sexuale (conjugare) în urma căreia se formează acei cu ascopori.

Mucoraceale din *fungi filamentosi* cu structură celulară de tip encariot și se reproduc prin spori asexuați (zospori, sporangiospori, condilospori, chlamidiospori, oidespori), și spori sexuali (ascopori, basidiospori, zigospori).

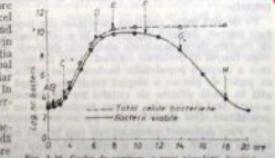
3.3.3. Dinamica multiplicării populației bacteriene

In condiții experimentale, dinamica multiplicării populației bacteriene este bine cunoscută. Procesul evoluă către o serie de faze succesiune (fig. 3.16).

• Faza de latență sau fază de acopere, între momentul introducerii germinalului în mediu de cultură (incubare) și momentul în care celeulele acestuia încearcă să se multiplifice. În cursul acestei faze, numărul bacteriori din inocul rămâne neschimbător sau chiar scade temporar. Cultura nu este vizibilă macroscopic. Această fază durează în medie cîteva ore.

• Faza de creștere sau fază de multiplicare logaritmichă, în care numărul bacteriori din cultura veche, populația rămâne săracită în principal din forme de rezistență, iar ratele sunt deficiente. În mediu său în producții intermedii de metabolism.

Multiplicarea unei asemenea bacterii este de regulă rapidă, deoarece în momentul în care acestea vorbăiesc și se adună prin simțire, în concentrație optimă. Dacă inițial bacterii sunt prelevați dintr-o cultură astăzi în

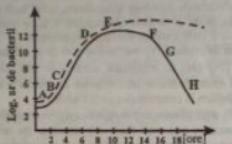


119

Creatura procreator de biosinteză

bacteriilor este excepțional de mare. Durata unei generații-intervall de timp dintre două diviziuni successive este tipică pentru fiecare specie, dar poate varia la aceeași specie în funcție de condițiile de mediu, fiind, în general, cuprinsă între 20 și 30 de minute.

Procesul multiplicării populației bacteriene este bine cunoscut. Aceasta cuprinde mai multe faze (fig. 4.1), care sunt descrise în continuare.



Faza de latență sau lag. Este cuprinsă între momentul introducerii germinalului în mediu de cultură (incubare) și momentul în care celeulele acestuia încearcă să se multiplifice. În această fază, numărul bacteriori din inocul rămâne neschimbător sau chiar scade temporar. Cultura nu este vizibilă macroscopic. Această fază durează în medie cîteva ore. Faza de latență apare ca o perioadă de adaptare în noile condiții de cultură. În această perioadă, bacteriile viabile din inocul își renumelează în celule metaboliști esențiali și sistemele enzimatici necesare creșterii.

La transvezare încocul într-un mediu nutritiv, se înfîncesc, în principal, două tipuri:

- dacă încocul bacterian provine dintr-o cultură aflată în curs de multiplicare și se transveză într-un mediu nutritiv cu aceeași compozitie, multiplicarea bacteriori își menține în continuare ritmul rapid (este cazul transvezării încocului în intermediar, operație efectuată numai pentru obținerea de cantități mai mari de încocul necesar fazelor următoare de biosinteză numită fază de regen;

- dacă bacteriile provin dintr-o cultură tot în fază exponentială de multiplicare dar se transveză în un mediu nutritiv cu altă compozitie, stînci ele au o perioadă de adaptare, creșterea lor nefind evidentă de la început.

cură de multiplicare în același condiții de mediu ca și cele oferite noi culturi inițiale, multiplicarea bacteriilor își menține în continuare ritmul rapid, la sfîrșit, dacă bacteriile provin diastro-cultură tot în fază exponentiază, dar că creștează pe un alt mediu decât în cel care au fost transbrate și nu îndemnăță, creșterea lor pe nouă mediu nu este evidentă decât prin îndemnăță, inducție a unei enzime corespondătoare sau o perioadă de latență.

Faza de latență apare deci ca o perioadă de adaptare la condiții noi de cultură, în care bacteriile viabile din inoculum adaptează la condiții noi de cultură. În această fază, bacteriile își ajustează metabolismul și sistemele enzimatiche își acumulează în celule metaboliști esențiali și sistemele enzimatiche necesare creșterii, în cadrul cărora aceste componente biochimice le lipseau datorită condițiilor de viață anterioare însășițării.

2) Faza de multiplicare exponentiază sau de creștere logaritmică este caracterizată prin aceea că, după o scurtă perioadă (circa 2 ore) de accelerare a creșterii, în care multiplicarea se produce cu o viteză progresivă crescătoare, acest ritm devine constant și caracteristic pentru un organism săvârșit. Această fază, ce include conditii de cultură, durata unei generații fiind minimă, în cadrul căreia se manifestă caracteristici speciale, precum rezistența la temperatură, la presiune, la concentrații de nutrienți, la anumite substanțe chimice, etc.

În continuare, creșterea bacteriilor se manifestă ca o fază de creștere exponentiază, în care se manifestă o scurtă perioadă de timp atât în natură, cât și în condiții artificiale. După un timp relativ scurt, tendință de multiplicare rapidă se reduce progresiv, datorită epuizării substanțelor nutritive din mediu și acumulării în el a produselor de catabolism în concentrații cu efect inhibitor.

Pentru că de altă parte, creșterea individuilor din populația bacteriană nu se mai face sincron, distorția apărând că în aceste condiții de incetinire a ritmului vegetal de diviziune celulară. Această fenomenă de incetinire și desincronizare a creșterii populărilor bacteriene se produce chiar dacă o cultură are atât în stadiu diferențiat ale ciclului lor de dezvoltare. Unii autori denumesc această fază de post-ingătină, cultura tindând spre un echilibru între diviziuni și morțalitate.

3) Faza dejetonă maximă este fază în care numărul celulelor viabile este maxim și rămâne constant o perioadă de timp care durează de la cîteva ore la cîteva zile, în funcție de sensibilitatea bacteriori la condițiile de mediu.

În cadrul căreia în culturi continui, numărul total al individuilor populației este constant și egal cu numărul celulelor viabile.

Inaceastă fază dejetonă maximă este caracterizată de faptul că

numărul celulelor viabile datorită morții și a născerii progresivă a celulelor din sanctorumă sunt mult mai mari față de celulele

morte, defecate, gigante sau ramificate, care se colorează slab sau capătă

colorație neagră pentru coloranți și prezintă sporii la specie sporogene.

Faza de declin. Este fază care se manifestă în cadrul căreia numărul celulelor viabile datorită morții și a născerii progresivă a celulelor din sanctorumă sunt mult mai mari față de celulele

morte, defecate, gigante sau ramificate, care se colorează slab sau capătă

FUNDAMENTELE BIOTEHNOLÓGIEI

Durata perioadei de latență variază, deci, în funcție de noile condiții de mediu pe care microorganismele le gasesc la transversare. Cu cît aceste condiții noi (mediu sucat, temperatură, pH, ș.a.j.) sunt mai apropiate de cele anterioare, cu atât perioada de lag este mai scurtă.

Faza de multiplicare exponentiază sau de creștere logaritmică. Această fază este precedată de o perioadă scurtă (cca 2h) de accelerare a ritmului de creștere, în care multiplicarea se produce cu o viteză progresivă mărită. După acestă perioadă, diviziunile sunt bine sincronizate, astfel încât numărul celulelor viabile se dublează brusc și la intervale regulate după o progresie geometrică: $2, 2^2, 2^3, 2^4, \dots, 2^n$, adică are loc o creștere exponentiază.

Capacitatea de creștere exponentiază se manifestă ca atare numai o scurtă perioadă de timp (2-3 ore). În continuare, tendința de multiplicare rapidă scade progresiv, datorită epuizării substanțelor nutritive din mediu și acumulării în el a producției de catabolism în concentrații cu efect inhibitor.

La fază de multiplicare exponentiază, celulele considerate a fi de tip enteric sau din dimensiuni mai mari decât cele specifice speciei de care aparțin, citoplasmă lor este omogenă, nu conține materiale de rezervă și are o mare atinută pentru coloranți baciari, datorită conținutului ridicat în ARN. Întrucât perioada corepondă ușor transformări permanentă, celulele aflate în fază exponentiază de multiplicare sunt cele mai potrivite pentru lucrări de genetica și biologie bacteriana.

Spre sfârșitul fazei de multiplicare logaritmică apare o așa-numită perioadă de post-log, în care are loc un fenomen de incetinire și de sincronizare a creșterii populației bacteriene, celulele atâtându-se în stadiu diferențiat al ciclului lor de dezvoltare. În această perioadă cultura tinde spre un echilibru între diviziuni și mortalitate. Din această fază sunt anumite biosimileze în culturi continue.

Faza staționară maximală. Este fază în care numărul celulelor viabile este maxim și rămâne constant o perioadă de timp care durează de la câteva ore, la câteva zile, în funcție de sensibilitatea bacteriori la condițiile de mediu.

Într-o cultură în fază staționară este determinată, de obicei, de epuizarea substanțelor nutritive din mediu sau de acumularea unor produși toxici. În această fază, celulele nu se mai multiplică, iar numărul total al individuilor populației este constant și egal cu numărul celulelor viabile. În această fază celulele bacteriene sunt considerate male, având caracteristici morfologice specifice speciei: dimensiuni, mai mici decât în fază de creștere exponentiază, citoplasmă mai puțin omogenă datorită apariției de incasă și acumulării unor substanțe de rezervă, afișându-să sporii de incasă și acumulării unor substanțe de rezervă,

întrucât sunt mai puțini, și sporele sunt mai mici față de celulele

morte, defecate, gigante sau ramificate, care se colorează slab sau capătă

Așa că cind este vorba de o lipă parțială de substanțe nutritive sau de acumularea unor produse toxice, multiplicarea continuă într-un incertinit, dar este contrabalanșată de o morțirea parțială cu următoarele: numărul celulelor stabile rămâne constant în timp ce numărul total al bacteriei din cultură crește și cît și mai mult crește. În această fază celulele bacteriene sunt considerate mortale, deoarece bacteriologia descrie drept caracteristică pentru fiecare specie, dezvoltarea mai mică decât în fază de creștere exponentială, citoplasmă mai puțin omogenă, datorită apariției de inclusi și acumulării unor substanțe de rezervă, aliminate moderat, normale, pentru coloranți și prezenta sporogene.

4. Faza de declin corespunde unei scăderi progressive a numărului celulelor viabile, mergeând pînă la sterilizarea bacteriologicală a culturii. La moment dat, numărul bacteriilor viabile scade progresiv, determinat în raport cu împărtășirea morții unei numărătură foarte mare de edule. Uneori celulele viabile liberate prin liza celulelor morante, determinat de prezența formelor de înoluție (celulele mici, sterice, deformate, gigante sau ramificate) se colonizează foarte slab, uneori chiar ca umbre, sau capătă chiar afinitate pentru colonizarea acizi, iar la specie sporogene apăsă în cultură foarte mulți spori. La sfîrșitul acestui stadiu se produc fenomene de autoînlăturare, ceea ce determină scăderea numărului total de celule din mediu.

Coprește ună deosebită hiperplazie, care nu poate apărea direct prin mai scăzute morții determinate de substanțe uscate a masei colture, doarca intr-o valoare a uscăciuță dintre constitutienii bacterieni elementari — C sau N — apreciate cantitativă a unei enzime sau a unui produs metabolic și evaluarea numărului total al celulelor bacteriene (vii și morante), cu ajutorul celulelor microscopic de numărat, sau a numărătură celulelor viabile (capabile de multiplicare) prin înămîntare pe mediu de cultură solidificat. Ca metodă indirectă se folosesc aprecierile gradulului de transmisie a radiației ultraviolete în mediu lichid, în raport cu un punct etalon sau la fotocolordimetru, deschisă absorbtiei la lungimi de undă de 2 800 Å specifică proteinei sau 2 900 Å, specifică pentru acizi nucleici etc.

Spre deosebire de bacteriile propriu-zise, actinomicetele cresc sub formă de colonii și în mediile lichide, deoarece la aceste microorganisme singurile个体 individuale sunt conidii.

3.1.2. Dinamica procesului creștere la fungi

Cinetica de creștere a levuriilor este similară cu cea a bacteriilor. Creșterea mucogeluriilor este limitată în mod caracteristic la extremitățile libere a hidrargilului posate pe suprafața suportului. Mucogelul preferă să crească în mediul contenant substanțe nutritive. Procesul a fost urmărit și în ambientul la miceliile septate, deși același principiu se aplică și celor eumicetice. După atingerea celulei terminale și biosinteză de perete celular, urmărește procesul de formare a septului transversal, avînd ca rezultat delimitarea a două celule fizice. Cea apărătă continuă ciclul de creștere și divizionă, pe cînd celula subterminală participă doar facultativ la creștere și anume nu-

395474
2007

BIBLIOTECA
CENTRALĂ

mai atunci cind produce o ramificare laterală, dotată, la rindul ei, cu capacitate de creștere apicală și de diviziune. În unele cazuri (la unele *Bacillus*) un singur miceliu poate atinge pînă la 15 metri. Pe măsură ce micelul crește la periferie, conținutul citoplasmăi poate să dispare în partea centrală, ceea ce ledează la coloniile. Creșterea unui miceliu pornind de la un inocul de spori sau de la un fragment micelian parcurge mai multe faze:

Faza inițială de lag, care durează cîteva ore, este caracterizată nu prin fenomene de creștere, ci prin procesele de germinare a sporilor sau de regenerare a halobiontului și lezate care au servit ca inocul.

Faza de creștere liniară, corespunzător perioadei în care pe suprafața mediului apare o colonie circulară care crește liniar în raport cu timpul. Viteza de creștere se menține constantă la marginea coloniei, în timp ce în zona ei centrală creșterea este mai lentă sau chiar incetează. Creșterea coloniei în suprafață nu este corelată cu creșterea ei în greutate. În mediul sărac în substanțe nutritive, colonia se extinde mai repede, însă sub forma unei rețele fine de hife, în timp ce pe mediul bogat, creșterea ei în diametru este mai lentă dar micelul format este mai gros.

Faza de închidere se trădă prin încreștinarea vitezei de creștere, pe măsură ce colonia se apropișă mai mult sau mai puțin de bariera mecanică reprezentată de marginea încintei în care se dezvoltă, dar ea este de fapt determinată de efectul dinăuntru al produselor de metabolism liberați din colonie. La unele specii se observă de la însușirea lizei miceliale în centrul coloniei. Încreștinarea ritmului de creștere apare mai repede cind cultura se dezvoltă în mediul bogat în substanțe nutritive și la temperaturi optime și supraoptimale, acumularea produselor de metabolism facîndu-se mai rapid în aceste condiții.

Creșterea coloniilor de mucogai pe mediul solid, lichide în culturi de suprafață sau submersive evoluază cu o viteză variabilă în funcție de tulipină, mediu de cultură și factorii de mediu (temperatură, μH , aerare, agitare, presiune osmotice etc.). La fungii nesupătați, alcumătura micelialei poate ajunge la 3 mm pe oră la 25°C. În mediul lichid, în culturi statice, fungii produc o „pinză” miceliana la suprafața lichidului astfel că diferențele părți ale culturii se găsesc în condiții diferite de mediu, în special sub raportul gradului de aerobioză.

De aceea, în procese biotecnologice industriale în care este necesară o dezvoltare abundentă și egală a mucogăinului, se asigură condiții fizioligice omogene de cultivare prin agitarea mecanică și aerare controlată a mediului. În aceste condiții se realizează o dispersare a micelului însoțită de apariția unor microcolonii sferice.

3.4. Mediile de cultură

Un mediu de cultură poate fi definit ca un suport nutritiv sterilizat, care permite dezvoltarea și studiul unui microorganism în afara mijlocului său natural. În procese biotecnologice mediu de cultură are o mare importanță asupra reproducibilității și eficienței tehnologiei respective. Pe baza diferențelor criterii privind compozitia, consistența, natura ingredientelor, medile se pot clasifica astfel:

- după consistență: medii lichide, solide, semisolide;

FUNDAMENTELE BIOTECNOLOGIEI

Datelor furnizate de tehnologia pilot elaborată constituie elemente de protecție pentru instalațiile industriale.



Fig. 5.2. Bioreactor de laborator, pentru obținerea enzimelor prin fermentație.

5.3. MEDIII DE CULTURĂ

In procese biotecnologice, medile de cultură sunt constituite din suporturi nutritive sterilizate care permit dezvoltarea și studiul unui microorganism, în afara mijlocului său natural. Compoziția medilor de cultură are o mare importanță asupra reproducibilității și eficienței tehnologiei respective.

În funcție de consistență, compozitie, scopul utilizării, medile de cultură se clasifică astfel:

- după consistență:
 - medii lichide;
 - medii naturale, care conțin elemente nutritive, de origine vegetală sau animală;
 - medii sintetice, care conțin numai compoziții cu structură chimică cunoscute, care pot fi dozate;
- după tipul respirator al microorganismelor cultivate: medii pentru microorganisme aerobe sau anaerobe;
- după scopul și frecvența interbușirii;
- medii de uz curent;

— după tipul respirației al microorganismelor cultivate: medii pentru microorganisme aerobe sau anaerobe;

— după compoziție: medii naturale, care contin elemente nutritive proveniente din vegetație, animale și medii sintetice, care conțin numai compuși cu structură chimică cunoscută, dozabili;

— după tipul și frecvența introducerii: medii de uz curenți și medii speciale de inolare care pot fi la rindul lor efective, selective, de îmbogățire, de conservare și de identificare.

La practica biotecnologică se utilizează în mod curent medii naturale, utilizate pe baza de subproduse agroalimentare (roturi și fructe ale culturilor, lemn, fâna de porumb, tărâțile de grâu, extracte din surub etc.). Acestea au inconvenienții mari: stabilitatea lor difă din cauza variabilității compoziției și al poluării substanțelor nedeterminate. Se cerează posibilitatea extinderii medierii sintetice, perfect reproducibile la scară industrială.

Indiferent de mediul utilizat, pentru dezvoltarea microorganismelor trebuie să ajungă suflare de carbonic, auri, fosfor, oligoelemente, factori de creștere.

Pentru creșterea randamentelor în fază de biosinteză se adaugă la mediul pozători care sănătățe având porțiuni structurale ale moleculelor proteică de biosinteză. În toate procesele biotecnologice sursa principală de energie ce constituie carboidrații. În prezent se cunosc două forme de biochimie a glucozei și se diferențiază mult cantitatea de energie din care o parte este întocmită de hidrogenul măcinator, iar restul este preluat de mediul de cultură alimentat cu ajutorul sistemelor de termostatare ale bioreactorelor.

Pepper și Harrison (1970, 1971) au demonstrat importanța compoziției elementare a microorganismului pentru stabilirea formulei corecte a mediului de dezvoltare. Autorii citați au stabilit necesarul de componente nutritive funcție de compoziția elementară a levurii *Candida utilis*. Acesta

se obține ca amonicac, necesarul minim fiind de $\left(\frac{8,2}{14}\right)$ 10 părți amoniac la 100 de părți biomastă uscată produsă. Potasial este furnizat ca KCl

$\left(\frac{74,5}{39}\right)$ 4,2 părți KCl la 100 părți de drojdie. Necesarul de fosfor

$\left(\frac{125}{31}\right)$ 4,9 părți de H_2PO_4 sau $\left(\frac{1,55}{31}\right)$ 7,5 părți de $(NH_4)_2PO_4$, caz în

care necesarul de amonicac scade la $\left(\frac{7,5}{1,9}\right)$ 8,5 părți iar necesarul de sulf

se justifică în proporție de $\left(\frac{0,4}{32}\right)$ 2,17 părți K_2SO_4 la 100 părți drojdie uscată.

Cele de mai sus reprezintă valori minime pentru dezvoltarea nerestrictată, elind nu unul din aceste elemente nu apare în materia primă.

Sarea de carbonic este totușă importantă și ca o mare parte a oxigenului. Răbdul oxigenului depinde desigur de acrarea mediului. Datorită eficienței scăzute a transferului de oxigen de la interfața bulilor de aer la mediul și spre la microorganism este nevoie de cantități de oxigen mult sporite. Greutatea echivalentă de oxigen consumată de către celule ar necesita să se con-

$$\frac{B}{S_0} = \frac{(1+\gamma)(W+k_2)}{\epsilon b_2 - W - k_2} \cdot \frac{A}{S_0} \quad (3.75)$$

Rata de diluare limită (W_{cr}): la $W > W_{cr}$, concentrația de celule microbiene din reactor scade continuu) este dată de:

$$W_{cr} = \frac{h_1 S_0 + k_2 + k_3 + k_4 + k_5}{2} \times \\ \times \left[\left(1 + \frac{4k_2 S_0 (k_2 - k_3) - k_2 (k_2 + k_3 + k_5)}{(k_2 S_0 + k_2 + k_3 + k_4 + k_5)^2} \right)^{1/2} - 1 \right] \quad (3.76)$$

Pentru sprijinirea concentrației S_0 , valoarea W_{cr} se apropie de limita $k_2 - k_3$, pentru ca reacțional de biosintează să fie productiv. S_0 trebuie să depășească valoarea $\frac{k_2 (k_2 + k_3)}{4k_2 (k_2 - k_3)}$; la $W = 0$ și $W = W_{cr}$, concentrațiile sunt egale.

A și B devinând nule.

Rândunical utilitarul substratului este:

$$Y = \frac{A + B}{S_0 - S} = \\ = \frac{W \left[1 + \frac{(1-\gamma)(W+k_2)}{\epsilon b_2 - W - k_2} \right]}{k_2 - k_3 \left[(W - (1-p_1))k_1 - p_2 k_3 + (1-p_2)k_2 + p_2 \epsilon b_2 \right] - p_1 k_4} \quad (3.77)$$

3.3.4. Influența concentrațiilor ridicate de substrat asupra cineticii dezvoltării microbiene

Celula microbiană, datorită volumului ei redus, este extrem de sensibilă la variațiile locale ale parametrilor procesului de biosintează, în special la variațiile concentrației de substrat. La sporirea concentrației speciilor nutriționale disponibile microorganismelor, dar numai pînă la o valoare limită, peste care sporirea concentrației speciilor nutritive rămîne fără efect, sau la sporuri exagerate se produce chiar negativ parametrii fiziolegiile celulare (prin inhibiție de suferință).

Acțiunea unui inhibitor asupra celulei microbiene se poate exercita prin:

- a) modificarea potențialului chimic al substratului, intermediarilor metabolici sau a produsului finit;*
- b) modificarea permeabilității peretelui celular și reducerea transportului substanțelor nutritive;*
- c) modificarea activității enzimelor implicate în procesul metabolic;*
- d) modificarea parametrilor funcționali ai celulei microbiene (capacitatea de multiplicare, mobilitatea, biosinteza unor metaboliti).*

Mecanismele prin care se realizează inhibiția sunt:

- a) reacție chimică cu una sau mai multe componente celulare;*
- b) adsorbția sau complexarea unor enzime sau coenzime;*
- c) intervenția în disocierea complexelor enzimatici;*
- d) intervenția în disocierea complexelor enzimatici;*

4.2. INFLUENȚA FACTORILOR DE MEDIU ASUPRA CREȘTERII MICROORGANISMELOR

Creșterea microorganismelor este influențată de o serie de factori de mediu, dintre care cei mai importanți sunt:

- concentrația substratului;
- calitatea și cantitatea inoculului;
- temperatura;
- pH-ul mediului de biosintează;
- agitarea;
- concentrația oxigenului dizolvat.

4.2.1. Influența concentrației substratului asupra procesului de biosintează

Celula microbiană, datorită volumului ei redus, este extrem de sensibilă la variațiile locale ale parametrilor procesului de biosintează, în special la variațiile concentrației de substrat. Mărirea concentrației de substrat în mediu de cultură poate conduce la sporirea numărului de celule microbiene, dar numai pînă la anumite limite, multiplicarea acestora fiind încreștină de procese de inhibiție care să le ajungă la nivelul celulei.

Acțiunea unui inhibitor asupra celulei microbiene se poate exercita prin:

- a) modificarea potențialului chimic al substratului, intermediarilor metabolici sau a produsului finit;*
- b) modificarea permeabilității peretelui celular și reducerea transportului substanțelor nutritive;*
- c) modificarea activității enzimelor implicate în procesul metabolic;*
- d) modificarea parametrilor funcționali ai celulei microbiene (capacitatea de multiplicare, mobilitatea, biosinteza unor metaboliti).*

Mecanismele prin care se realizează inhibiția sunt:

- a) reacție chimică cu una sau mai multe componente celulare;*
- b) adsorbția sau complexarea unor enzime sau coenzime;*
- c) intervenția în disocierea complexelor enzimatici;*
- d) intervenția în disocierea complexelor enzimatici;*

19)

interacționi cu genoul sau cu procesul de transcriere; f) influențarea parametrilor funcționali ai celulei microbioane (viteza de mutare, capacitatea de a doboră, mobilitatea, biosintiza unor metabolitii etc.).

Mecanismele prin care se poate exercita acțiunea sistemului: a) reacții chimice cu una sau mai multe componente celulare; b) adsorbția sau comulgarea de enzime, coenzame sau componente nutritive; c) intervenția în acțiunea reacțiilor biochimice; d) intervenția în disocierea complexelor enzimatice; e) modificarea parametrilor fizico-chimici ai mediului de biosinteză (pH, tensiune electrică, constantă dielectrică, capacitate de solvatare etc.); j) interacția cu funcțiile celulare de control.

20)

Inducerea activității enzimelor implicate în procesul de biosinteză prin complexare cu excesul de substrat este descrisă de ecuația:

$$V = \frac{V_m}{1 + \frac{K_1}{S} + \frac{S^{n-1}}{K_n}} \quad (3.78)$$

21)

în care: V este viteza de reacție;

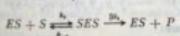
S — concentrația de substrat.

Ecuția (3.78) valabilă pentru cazul cind enzimele și substratul formează un complex inactiv se poate extinde pentru cazul formării unor complexe inactive multiple:

$$V = \frac{V_m}{1 + \frac{K_1}{S} + \sum_{j=1}^n \left(\frac{S}{K_j} \right)} \quad (3.79)$$

22)

Dacă enzima are mai mulți centri activi și prezenta sau absența substratului îl ia în același mod în considerare, atunci ecuația va fi:



23)

Procesul este descris de ecuația:

$$V = \frac{V_m \cdot S \left(1 + \frac{p \cdot S}{K_m} \right)}{S + K_m + \frac{S^p}{K_m}} \quad (3.80)$$

24)

În care:

$$V = \frac{dP}{dt}; \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}; \quad K_m' = \frac{k_3 + p k_2}{k_3}$$

Modelele propuse reprezentă cazuri limite și utilizează simplificări ale comportării dinamice instantanee a bulelor de aer din reactor. Evaluarea cantitativă exactă a transferului de oxigen pe baza fenomenelor de coalescență și redispersare, descrinând modificările suferite de populația de bule din reactor face necesară introducerea de elemente suplimentare privind dinamica fluidului.

4.2.3. Transferul de masă din fază gazoasă prin fază lichidă spre fază solidă consumatoare de oxigen

Pentru evaluarea cineticii transferului de oxigen s-a utilizat o metodă bazată pe oxidarea practic instantaneă a sulfitului de sodiu, catalizată de metale grele. În prezența oxigenului dizolvat, Oxidarea anionului sulfit fiind mult mai rapidă decât absorbția oxigenului, poate fi utilizată la determinarea cantitativă a acestuia din urmă. În acest mod s-a stabilit ecuația:

$$C_g = K_k \cdot a \cdot (C_o - C_t) \quad (4.54)$$

în care: C_g este concentrația oxigenului dizolvat;

K_k — coeficient global de transfer;

a — suprafață interfacială gaz-lichid;

C_o — concentrația oxigenului la interfață, egală cu valoarea de saturare pentru sistemul aer-apă, la temperatura dată;

C_t — concentrația oxigenului în apă.

Pentru sistemele intens aerate, valoarea produsului $K_k \cdot a$ sunt cuprinse între 70...400 mMoL absorbit/1 oră.

O formă generală a ecuației de transfer de masă este:

$$\frac{dW_g}{dt} = \frac{P_o - P_t}{\frac{1}{H} + \frac{1}{k_k}} - K_{sol}(P_o - P_t) = \frac{C_o - C_t}{\frac{1}{H} + \frac{1}{k_k}} = K_{sol}(C_o - C_t) \quad (4.55)$$

unde: P_o , P_t — sunt presiunile partiale ale oxigenului în fază gazoasă, respectiv în echilibru cu concentrația globală din fază lichidă;

k_k — coeficientul de transfer de masă al filmului gazos;

k_l — coeficientul de transfer de masă al filmului lichid;

K_{sol} , K_{sol} — corespondenții globali de transfer de masă;

C_o , C_t — concentrațiile oxigenului dizolvat în echilibru cu presiunile partiale P_o în fază gazoasă și P_t în fază lichidă;

H — constanta lui Henry ($P_t = H \cdot C_t$; $P_o = H \cdot C_o$);

W_g — cantitatea de oxigen absorbită.

prescriși se adaugă diverse substanțe chimice (acizi sau bazi) ale căror proprietăți fac să se realizeze o valoare pH-ului este sub ceea ce prescriează, se pot adăuga și de necesar, soluții de NaOH sau KOH în funcție de compozitia chimică a mediului și de necesar, în situația în care valoarea pH-ului este prea mare, se poate adăuga acid clorhidric, acid sulfuric sau acid azotat, în funcție de caracteristicile microorganismului (ionul Cl⁻ și să inhibe competiția), de compozitia chimică a mediului (adăugarea de acid sulfuric se poate conduce la formarea unor slăuri greu solubile), precum și de materialul de construcție al vaselor de reacție și al bioreactorelor (probleme de coagулare).

— prin efectul de dislocare a acizilor și bazelor, pH-ul acționează asupra caracteristicilor neputinței celulei, modificând proprietățile ei de a cădea la diferite materiale (sticlă, metală) precum și cele de flocculare.

4.2.5. Concentrația de oxigen dizolvat

În culturile aerobe, este esențial să se realizeze dizolvarea în mediu a întregii cantități de oxigen necesare microorganismului în orice moment al fermentației, prevăzându-se în general un creștere exces față de nevoie. De aceea, se urmărește în general obținerea unei aerări căt mai eficiente, transferul de oxigen din fază gazosă în fază lichidă (mediul de fermentație) având loc cu viteză mare.

În cazul în care procesul de biooxidare se desfășoară în laborator la flacone agitați, acestia depinde de următorii parametri:

— viteza de rotație sau trenajulării a agitatorului;

— nărcisoza fluoroclorică Erlenmeyer;

— volumul de mediu de cultură din flacon;

— creșterea turbulenței prin pieză.

Efectiv există mai multe metode de determinare a eficienței aerării:
— metoda sație, care permite măsurarea vitezei maxime de transfer a oxigenului din aer în mediu;

— metoda polarografică de determinare a concentrației oxigenului dizolvat în mediu;

— utilizarea electroodului cu membrană pentru măsurarea concentrației de oxigen;

— utilizarea oxiatorului paramagnetic de O₂, care analizează compozitia de gaze din interiorul unei sigilări.

În urma la ieșirea din bioreactor și o cortură cu compozitia celui care intră, poate evaluați cinetică transferului de O₂ și se utilizează de cele mai multe ori prima metodă bazată pe oxidarea preste, instantaneu a sulfidului de sodiu.

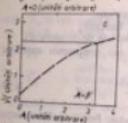
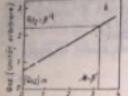
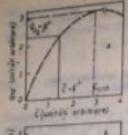


Fig. 4.15. Dependenta vitezei de dezvoltare, vitesei de respiratie si concentratiei de oxigen din mediul de biosintetza de pe concentratia aerului.

momentul atingea concentratiile ridicate de obicei cu
tar necesară de oxigen la celulele de microorganisme.

Necesarul de oxigen al culturii rezinta procesul celor doi parametri.
utilizat. Datorita vitelor mai mari de utilizare a monosaccharidelor fata de
la altul altura glucozelui ca surst de carbon, fata de zaharoz.

Necesarul de oxigen este de altfel limitat de viteza de furnizare a
substratului redus de către enzime din ciclul respirator și de cantitatea și
caracterul acestor enzime. Componentele anorganic ale mediului de biosintetă
pot influența și împărtășește transformările intracelulare (prin mărirea
concentrației ionilor fosfat în mediul de biosintetă al clortetraciclinei,
prin care se dublează).

In anumite conditii (ad. la specială dezvoltarea fungilor se formează
agregate de microorganisme care modifica sensibil comportarea sistemului).

Concentratia corespunzatoare valorii maxime a \dot{Q}_O_2 are valori cupinse intre 0,1 ... 1,0 p.p.m. Valoarea \dot{Q}_O_2 depinde direct proporțional de rată de creștere specifică, intersecția cu ordonata reprezentând \dot{Q}_O_2 minimă necesară menținerii activității celulare. Figura 4.13 arată dependența ratei specifice a formării metaboliștilor de pe concentrația specifică de creștere. Corelația liniară (fig. 4.14) poate fi descrisă de ecuații liniare sau în alte forme, după cum microorganismul utilizează și condițiile de dezvoltare.

Produsul dintre rata consumului de oxigen \dot{Q}_O_2 și concentrația celulelor de microorganisme C_e din mediul de biosinteză reprezintă necesarul de oxigen pentru unitatea de volum de cultură:

$$\text{Necesarul de } \dot{Q}_O_2 (\text{mM}_{O_2}/\text{l oră}) = C_e \cdot \dot{Q}_O_2 / 22,4 \quad (4.63)$$

unde: C_e este concentrația în grame celule s.u/l; \dot{Q}_O_2 se exprimă în l/oră; iar 22,4 – factorul de transformare în mM.

Acesta valore a necesarului de oxigen reprezintă maximul valabil pentru $C_e > C_{e_{max}}$.

Este esențială, în special din punct de vedere a conducerii economice a proceselor de biosinteză, cunoașterea exactă a modului de variație în timp a necesarului de oxigen și a ratei consumului de oxigen (fig. 4.14). Rata de consum de oxigen sporște rapid pînă la o valoare maximă încă din primele stadii ale procesului de biosinteză, scăzînd apoi. Valoarea maximă (care nu coincide de obicei cu
tar necesară de oxigen la celulele de microorganisme).

Necesarul de oxigen al culturii este influențat de mediul de biosinteză utilizat. Datorita vitezelor mai mari de utilizare a monosaccharidelor fata de la altul altura glucozelui ca surst de carbon, fata de zaharoz.

Necesarul de oxigen este de altfel limitat de viteza de furnizare a substratului redus de către enzime din ciclul respirator și de cantitatea și caracterul acestor enzime. Componentele anorganic ale mediului de biosintetă pot influența și împărtășește transformările intracelulare (prin mărirea concentrației ionilor fosfat în mediul de biosintetă al clortetraciclinei, prin care se dublează).

In anumite conditii (ad. la specială dezvoltarea fungilor se formează agregate de microorganisme care modifica sensibil comportarea sistemului).

Coeficienții proceselor de biosinteză

constanță de metale grele în prezență oxigenului dizolvat; în acest mod s-a stabilită:

$$v = K_t \times \alpha \cdot (C_g - C_s),$$

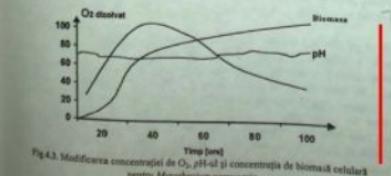
în care: v este viteza de transfer a oxigenului prin filmul de lichid de la suprafață hidrofilă; K_t – coeficient global de transfer; α – suprafață interfacială gaz – lichid; C_g – concentrația oxigenului la suprafață, egală cu valoarea de saturare pentru sistemul aer – apă, la temperatura dată; C_s – concentrația oxigenului în apă.

Pentru sistemele interesaeră, valoarea produsului " $K_t \cdot \alpha^*$ " sunt cuprinse între 70 și 400 mM O_2 absorbit/loc.

În cazul reactorelor de biosinteză, acerarea se aplică unui sistem deschis de complex, conținând numeroase substanțe dizolvante și având o concentrație ridicată de microorganisme suspendate. Alegerea parametrilor sistemului de acerare este determinată de necesitatea furnizării unei cantități de oxigen suficiente pentru a atinge o valoare maximă a activității metabolice în reacțoarele de biosinteză; în acest caz, un anumit microorganism și un anumit mediu de cultură se caracterizează printre rate de utilizare a oxigenului specific.

Pentru conducește unui proces este esențială cunoașterea exactă a modului de varianță în timp a necesarului de oxigen și a ratei consumului de oxigen.

Rata consumului de oxigen sporește rapid pînă la o valoare maximă înca din primele stadii ale procesului de biosinteză, scăzînd apoi (fig. 4.14). Valoarea maximă și ratea de consum a oxigenului (\dot{Q}_O_2) coincide, de obicei, cu momentul atingerii concentrației ridicate de la celulele de microorganisme. Necesarul de oxigen al culturii este influențat de mediul de biosinteză utilizat. De exemplu, datorită vitezelor mai mari de utilizare a monosaccharidelor făță de disaccharide, concentrația de oxigen este dubluă la utilizarea glucozelui ca surst de carbon față de zaharoz.



S este concentrația speciilor saline dizolvate, g/1000 g;
 F — factor numeric ($= 1$ pentru apă și soluții diluate; $= 0,95$ pentru concentrații ridicate de microorganisme)

Concentrația de microorganisme. La concentrații ridicate de microorganisme, concentrația fluidului din reactorul de biosințeză sporește mult (se ating valori de 10 000 cP). În aceste condiții disperza puterii agitatorului scade la distanță mică de zona sa de acțiune directă, iar recircularea conținutului reactorului devine minimă sau se anulează. Scade și eficiența sistemului de aerare, bulile înzădă să circule prin canale preferențiale, cu rezistență redusă la înaintare. Una din soluții utilizate curent este montarea unui al doilea agitator la oarecare înălțime deasupra primului, determinând o mai bună uniformizare a conținutului reactorelor de biosințeză cu prețul însă al măririi substantiale a consumului energetic.

Barbotarea aerului prin materiale poroase. Permite obținerea de suprafețe interfațe mari, prin micșorarea diametrului bulilor furnizate. Dezavantaj principal este determinat de depunerea sau dezvoltarea microorganismelor pe suprafața rugoasă a barbotorului și de rezistența hidrodinamică neuniformă a perilor care determină formarea de canale preferențiale. O variantă a barbotării din materiale sintetice este constituită sistemul format dintr-o sferă de stirem înțipărată pe o conductă perforată, prin care se barbotează aerul — sistem care prezintă și avantajul unei căderi mai mici de presiune.

Barbotarea aerului prin conducte perforate. Conductele perforate constituie echipamentul preferat pentru reacțoarele de biosințeză de volum mare, în care înălțimea coloanei de lichid determină mărimea timpului de contact între lichid și regimul turbulent sporește transferul de masă, micșorând împotrivă diametrul orificiilor barbotorului.

În condiții de fluxul turbulent, dimensiunile bulilor de gaz sunt influențate de valoarea *numărului lui Reynolds* în modul descris de ecuație:

$$\frac{\Sigma \Delta P}{\Sigma \Delta d^2} = \frac{D_L \cdot V \cdot \rho}{\eta_c} \quad (4.54)$$

în care: V este viteză fluxului de aer.

Barbotarea aerului cu agitare mecanică a fluidului este caracterizată prin ecuația:

$$k_p \cdot \left(\frac{D_L}{D} \right) = \left(\frac{n D_L \rho}{\eta} \right)^2 \cdot \left(\frac{\Sigma \Delta P}{D} \right)^2 \quad (4.85)$$

în care: D_L este diametrul circumferinței descrise de agitator;
 η și γ sunt constante experimentale.

FUNDAMENTELE BIOTECHNOLOGIEI

Alți factori care influențează transferul de O_2 sunt:

- prezența în mediul de cultură a agenților tensioactive, care determină o micșorare a coeficienților de transfer;
- concentrația de microorganisme: la concentrații ridicate de microorganisme, viscozitatea mediului crește, iar eficiența sistemului de aerare scade, bulile circulă și circule prin canale preferențiale, cu rezistență redusă la înaintare;
- sistemul de agitare al bioreactorului, care influențează sensibil concentrația oxigenului dizolvat, o agitare eficientă a mediului de cultură conducând la o dispersie corepunzătoare a bulelor de aer și, deci, la mărirea coeficientului de transfer al oxigenului;
- echipamentul de aspirație utilizat, care permite obținerea unei dispersii uniforme a bulelor de aer: conductele perforate constituie echipamentul preferat pentru reacțoarele de biosințeză, de volum mare;
- suprasemnele, care favorizează mărirea concentrației de oxigen în mediul de cultură, în general procesele biotecnologice fiind conduse la suprăpresiuni între 0,5 și 1 bar (în scopul micșorării riscului de infecție).

5...6°C
de n-ai
stămat
ridicat,
urtează,
st.
temp de
1 minu-
te (Bizo-
-0 Keclidi

sterilizari
a loc
si micro-
cinal mai
cumulati-
chiar in

resta-
giu popa-

R a u-a
creștere

De acela-
si zile
ment ale
inoculat
stare este
or este de
căi puțin
teva zile.

soprijetii
le reacție
unicașe
mălarii cu
un inocul
dardizate.

e:
(culturile
t de must
(amilaza),

it.
s in canul
inalcoool,
sporulare,
pe mediele
se a sporu-

lare, intensă, precum și vîrstă optimă a sporilor care formează inocul. Medile de sporulare trebuie utilizate săt formate din trăie de gru sau pîne unece-
rate cu apă în raport de 1:1.

În urma treptătii de inoculare celule vegetative pot fi prelevate

dintr-o fază timpurie de creștere de obicei din fază exponentială.

În urma fuziunilor care nu prezintă avantajul de a produce abunden spori sexuați cu inocul se vor utiliza micelile vegetative. Problema standardi-
zării inoculului devine astfel mai dificilă decât studiul de dezvoltare al

culturii reprezentă un alt factor ce va influența cultura din treptă următoare.

In cadrul experimentelor cu *Trichoderma* s-a relevat faptul că vîrstă inocu-
lului vegetativ joacă un rol considerabil în obținerea unor curbe de creștere cu
un grad de variație scăzut.

În condițiile dezvoltării la suprafață a culturii de inocul se impune omogenizarea miceliei, facilitând efectuarea operației de inoculare. În această
etapă trebuie avut în vedere și efectul heterocaroziei asupra randamentului

diferitelor producători utilizati în procesele biotecnologice.

Ajutor microscopic. Problema obținerii unui inocul standardizat în cazul
ajutorului microscopic este complicată de existența heterogenității condițiilor
biologice în care cresc celulele individuale pe suprafața unui mediu soli-
citat cu agar.

Inocul poate fi obținut ca bune rezultate din culturi dezvoltate pe mediu

lichide, omogenizate, în fază de creștere exponentială.

Pentru obținerea inoculului de ajutor microscopic diverselor specii de *Chlorella*,
Sauvagea, *Anabaena*, *Euglena*, s-a dovedit a fi adecvate culturile continuu, deoarece s-a demonstrat că algele nu suferă mutații frecvente.

4.3.2. Infleștirea dimensiunii inoculului asupra proceselor biotecnologice

Calitatea și cantitatea inoculului joacă un rol important pentru
obținerea unor metabolizi cu viteze și randamente dorite de biosințeză. De
cate mai multă oră este necesară o cantitate mare de inocul pentru a determina
o dezvoltare rapidă a dezvoltării culturii, respectiv o reducere a riscului
de contaminare. În majoritatea cazurilor este necesar ca cantitatea inocula-
bilă să se situeze între 3-10% din volumul total al culturii). În cazul fungilor
filamentoși dimensiunea inoculului are efecte atâtpea metabolismului produc-
torului mult mai profunde decât la bacterii sau levuri.

Prin urmare, influența dimensiunii inoculului asupra productivității unor
microorganisme, numeroși autori au relevat, spre exemplu că deviația stan-
dardă la câteva culturi ale diverselor fungii pentru obținerea de micelin, tinde să
devină foarte mare la inocule mici.

Pentru standardizarea densității inoculului se extrage o parte bine deter-
minată (preferabilă raporturi prestable între volumul inoculului și
volumul microbial ce va fi inoculat) din cultura aflată într-un anumit stadiu
de evoluție optimă și se obținează una producție maximă a metabolismului dorit și se determină
parametrii specifici (numărul de germezi pe unitatea de volum, sau conținutul în
numărul vaccini reportată la unitatea de volum).

Cinica proceselor de bioinoculare

87, 88

- modificarea parametrilor fizico-chimici ai mediului de bioinoculare (pH,

temperatură, concentrația disolvătoare, capacitate de solvare);

- intervenția în funcțiile celulare de control.

Datorită acestor fenomene, concentrația mare de substrat inhibă dezvoltarea
microorganismelor într-un anumit grad și ajungând chiar la inhibiție totală. Din acest
motiv, se urmărește ca sistemul de bioinoculare să stabilească concentrația optimă a
substratului astfel încât să se parcurse. De exemplu, pentru foarte
multe bacterii, concentrația de 10-15% în surse de carbon (glucoză, zaharoză) este
inhibitoare, elă dezvoltându-se bine la valori ale sursei de carbon sub 10%.

Acente este motivul pentru care în soluții foarte concentrante de zahăr (de
exemplu dulcuri, siropuri) microorganismele, în general, nu se dezvoltă, acestea
putându-și conserva pe o lungă perioadă de timp.

4.2.2. Infleștirea dimensiunii inoculului

Cantitatea și calitatea inoculului joacă un rol important pentru obținerea
unei metabolizi cu randamente dorite de bioinoculare. Cel mai adesea se utilizează o
cantitate mare de inocul pentru a determina o declanșare rapidă a dezvoltării culturii,
concomitent cu reducerea riscului de contaminare.

În majoritatea cazurilor este necesar ca inocul să se situeze între 3 și 10%
din volumul total al culturii.

Pentru fiecare tehnologie în parte se stabilizează așa-numitul "raport optim de
inoculare", care definește cantitatea optimă de inocul.

Pentru asigurarea unui produtivitate bună și pentru măsurarea densității
inoculului, se extrag probe din cultura aflată într-un anumit stadiu de evoluție
optim pentru obținerea unei producții maxime a metabolismului dorit și se determină
parametrii specifici (numărul de germezi pe unitatea de volum, sau conținutul în
numărul vaccini reportată la unitatea de volum).

Efectele determinate de cantitatea și vîrstă inoculului sunt specifice pentru
diferite microorganisme.

La bacterii, cind se utilizează o cantitate mare de inocul, se micșorează
faza de lag. Aceasta se datorează formării și acumulării unor metabolizi inter-
mediari exemplu care pot difuza în celule și în mediu de cultură mai rapid decât la
cand utilizării unui inocul mic. Uneori, însă, cantități mari de inocul determină
spații unuia fenomene de autoinhibiție, datorat sensibilității celulelor bacteriene
față de unii prodigi metaboliști intermediari.

Cind cantitatea de inocul este încă prea mică, faza de lag poate fi
prolungată la infinit și aceasta nu poate asigura la o dezvoltare normală a culturii
în microorganisme. S-a observat că în cazul bacteriorilor, pentru inițierea dezvoltării
unei inocule, este necesară încrezătoare în mediu de cultură a unei concentrații critice

tati ca substantăzăcătă la unitatea de volum). Pentru fiecare tehnologie în parte se stabilește dimensiunile optime ale inoculului, precum și starea fizică logică a microorganismelor, la momentul operației de inoculare, necesară pentru asigurarea productivității și reproducibilității maxime.

Efectele determinante de mărimea inoculului la bactérii sau fungi este condiția cu transpirat metabolismul intermediar esențial produs de cultura tineră, cu transpirat metabolismul intermediar esențial produs de cultura tineră, pînă la momentul cînd se atinge o concentrație critică a acestor compuși în interiorul celulelor și în mediu de cultură. Numerosi autori au descris posibilitatea transportului de oligocomplexe de către spori fungilor sau bacteriilor, determinând efecte diferențiale de mărimea inoculului.

Efectele determinante de mărimea inoculului sunt specifice pentru diferite microorganisme.

Bacterii. Măsurarea fazăi de lag se utilizează într-un inocul mare se datorează faptului că microorganismul care trebuie să fie produsă de către cultura interioară. Astfel o cultură care provine dintr-un inocul masiv, va semnală o concentrație critică din aceste componente (care pot difuza în celule) și în mediu (fond de cultură) mai rapid decît o cultură provenind dintr-un inocul mic. Mărimea minimală a inoculului care permite dezvoltarea culturii bacteriene depinde de compoziția substratului. Faza de lag poate fi prelungită la infinit dacă inocul este mic, în ciuda prezenței celulelor viabile. De exemplu, a fost demonstrat „total sau nimic” de către H. A. Irmann (1957).

Cercetările comparative asupra mediilor utilizate pentru dezvoltarea culturilor bacteriene amotocătă cu inocule mici, au relevat efecte determinante de pevenire unor diferențe cauzătoare de compuși, similari, de importanță universală. S-a demonstrat importanța formării unor agenți chelatatori funcție de cantitatea de micos, sau substanțe similare care adăugate în mediu de cultură actionează ca redactor de fază lag.

Mayer și Traxler (1962) au arătat că anumite compuși care pot explica cedarea metalelor acționează asupra microorganismelor *[Bacillus subtilis]*. Acestea sunt necesari o concentrație critică de mangan pentru inițierea dezvoltării. Aceste cercetări subliniază importanța ionilor metalelor grele pentru fază lag la bacterii.

Unele caracteristici mari de inocul determină apariția unui fenomen de autoincompatibilitate a germinării sporilor bacterieni. Acest efect se datoră sensibilității variabile a celulelor bacteriene față de unii produsi metaboliici funcție de vîrstă și dezvoltaremetul culturii. Mărimea inoculului utilizat, în cazul tulipinilor de cultura, determină diferențe stări fiziolegice ale celulelor funcție de care facă ca laga să fie scurtă.

Levuri. În cazul levurilor cantitatea de inocul poate influența durata fazelor de lag și studiile ulterioare de dezvoltare similar cu cele descrise în cazul bacteriilor.

Fungi filamentoși. Importanța standardizării inoculului vegetativ pentru anumit grup de organisme este hotărâtă. Astfel pentru obținerea unui randament maxim de boala și a unui ritm rapid de dezvoltare este necesar să se utilizeze un model vegetativ format din mirosul afiat în fază de autotilizare sau din mirosul în fază de dezvoltare. Când se utilizează inocul sporifer pot apărea fenomene de autoincompatibilitate sau autoincompatibilitate a germinării sporilor.

de metale grele. De exemplu, pentru un inocul de *Bacillus subtilis* este necesară prezența în mediu de cultură a unei concentrații minime de mangan, în vederea încetării dezvoltării. Aceste cercetări subliniază importanța ionilor metalelor grele pentru fază de lag la bacterii.

Cantitatea de inocul la bacterii are influență mare asupra stadiilor ulterioare ale culturii, determinând diferențe stări fiziolegice ale celulelor în funcție de care variază capacitatea de biosintează a metabolismului dorit.

În cazul levurilor, cantitatea de inocul poate influența, de asemenea, durata fazelor de lag sau studiile ulterioare de dezvoltare, similar cu cele descrise în cazul bacteriilor.

În cazul fungilor, importanța standardizării inoculului vegetativ pentru acest grup de microorganisme este hotărâtă. Astfel, pentru obținerea unui ritm rapid de dezvoltare este necesar să se utilizeze un inocul sub formă de suspensie de spori. De asemenea, poate să apară fenomenul de autoinhibiție sau autostimulare a germinării sporilor, datorită prezenței unor substanțe produse în timpul germinării sau în fază ulterioară. Astfel că, în cazul fungilor, cantitatea de inocul influențează mărimea și forma miceliilor precum și randamentul în metabolismi.

Raportul de inoculare trebuie să fie stabilisit astfel încât cantitatea de micelii dezvoltării ulterioare să nu fie prea mare în detrimentul secreției metabolismului dorit. O dezvoltare abundentă a masei miceliene conduce în același timp la un consum mare de sustrat de carbon, cultura fiind astfel inefficientă.

4.2.3. Efectul temperaturii asupra creșterii microorganismelor

Temperatura mediului în care are loc procesul de biosintează este un factor extrem de important pentru activitatea microorganismelor. Temperatura este un factor care acționează în mod direct asupra microorganismelor și diferența între temperatura mediului înconjurător și cea din interiorul celulei trebuie să fie nulă. Pentru un proces de biosintează industrial, temperatura poate fi considerată unul dintre parametrii fizici cei mai importanți, care este implicat profund, prin efectele sale, în optimizarea procesului.

Variările temperaturii au efect asupra randamentului de transformare a substratului în produsul dorit, asupra cerințelor nutritive ale microorganismului și compozitiei biocompatibile precum și asupra vitezei de creștere microbiano.

În funcție de domeniul de temperatură în care microorganismele ating vîrsta maximă de creștere, acestea se clasifică în: criofile, mezofile și termofile (fig. 4.3). Se observă că fiecare grup de microorganisme are un domeniu de creștere specific, astfel că creșterea este maximă. Microorganismele industriale sunt, în general, mezofile, astfel încât acest domeniu este plasat în intervalul 25–35°C.

4.3.6. Prelucrarea mediilor de biosinteza
Prelucrarea primara a mediilor de biosinteza

Prelucrarea primara a mediilor de biosinteza cuprinde operatii consecutive din tehnologia chimica: limpezirea mediilor prin sedimentare in cimp gravitacional sau centrifugal; recuperarea celulelor microbiene; dezagregarea acestora; concentrarea fazei lichide; alturi de acestea se utilizeaza si procedee mai specifice: fractionarea chromatografica; precipitari cu solventi organici sau sursuri anorganice; purificari si concentrari prin ultrafiltrare sau osmose inversa si asa mai departe.

Din diagrama generala din fig. 4.29 demonstreaza complexitatea proceselor astfel, ca si volumul ridicat al echipamentului industrial implicat. Schema de flux varianta de la un preparat la altul sau chiar dupa tehnologia concreta de obtinere a aceluiasi preparat.

4.3.4.1. Filtrarea mediilor de biosinteza

Theoria filtrarii si principalele echipamente industriale necesare sunt cunoscute din industria chimica si nu vor fi expuse in cele ce urmeaza: In sfarsit de necesitatii menținerii unui nivel superior de igienă (sterilitate) filtrarea mediilor de biosinteza este doar in multă măsură deosebită de filtrarea mediilor reactiei chimice, principalele deosebiri fiind: compozitia chimica deosebit de complexă a mediilor de biosinteza industrială și apariția materialului biologic (bacterii, fungi) care complică atât teoria cît și realizarea practica a operației de filtrare; materialul solid separat în urma filtrării mediilor de biosinteza este hidratat și extrem de compresibil; epuizarea sa în lichid pînă la umiditate scăzută este dificilă; la separarea prin filtrare a microorganismelor contaminante (filtrare sterilizantă), procesul este descris de legile operației de sterilizare.

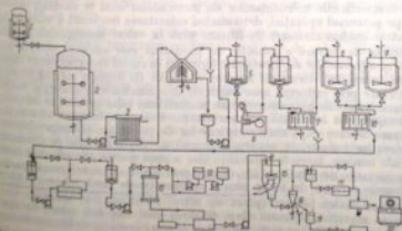


Fig. 4.29. Schema tehnologica a unei stări pilot pentru obtinerea prepartelor farmaceutice.

7 PRELUCRAREA MEDIILOR DE CULTURĂ ÎN SCOPUL IZOLĂRII ȘI PURIFICĂRII PRODUSELOR DE BIOSINTEZĂ

Inainte de a fi purificate, substanțele organice obținute pe cale biotecnologic sunt în prealabil izolate din lichidul de cultură (dacă sunt extracelulare) sau din biosă (dacă sunt intracelulare) într-o formă parțial purificată, aplicând metode de separare general valabile pentru toate produsele de biosintează.

Prelucrarea primara a mediilor de biosinteza cuprinde operații aplicate, în general, în tehnologia chimică cum ar fi: filtrarea, centrifugarea, decantarea, concentrarea fazei lichide, dezagregarea celulelor, extractia, uscarea, atomizarea. Se aplică, de asemenea, în procese mai specifice cum ar fi precipitarea cu solventi sau cu sursuri anorganice, purificari și concentrari prin ultrafiltrare.

Echipamentele industriale implicate sunt complexe și specifice. Schema de flux variază de la un preparat la altul, în funcție de tehnologie.

Separarea produselor din lichidul rezultat din fermentație constituie o problemă difficultă, indiferent de procedeu aplicat. Dificultățile provin din faptul că produsele biologice active obținute în general prin biosintează sunt substanțe termolabile, ceea ce impune evitarea degradării sau modificării chimice a acestora.

Pentru a alege cea mai adecvată metodă de separare a produselor bio-sintetizate, este necesar să se cunoască proprietățile fizico-chimice a acestora și suntem:

- *solubilitatea:*
 - în apă sau în soluții diluente de săruri;
 - în solventi polari (metanol, etanol, acetona);
 - în solventi slab-polari (cloroform, hidrocarburi);
- *stabilitatea în soluție*, în funcție de pH; efectul temperaturii; efectul soluțiilor tampon; efectul solventilor organici;
- *stabilitatea în stare solidă*, în funcție de temperatură precum și efectul umidității asupra produsului;
- *proprietăți fizice:*
 - dializabilitatea prin membrane;
 - adsorbția pe suprafețe solide;
 - migrația în câmp electric;
 - sedimentarea în ultracentrifuge;

Ecuția generală Kozeny:

$$u = \frac{A}{K} \frac{\epsilon^2}{(1-\epsilon)^2 S^2} \frac{\Delta p}{\eta l}$$

în care: u este viteza de parcurgere a stratului de material filtrant;

A — suprafața de filtrare;

ϵ — fracție de galben a materialului filtrant;

S — suprafață specifică a materialului filtrant;

Δp — diferența de presiune între cele două fețe ale materialului

filtrant;

η — viscositatea medie la supus filtrării;

l — grosimea patului de material filtrant;

K — constantă, pentru un anumit set de condiții experimentale,

descrie procesul numai într-un mod cu total aproximativ, întrucât:

— regimul de curgere al fluidului se abate mult de la condițiile de laminaritate;

— pachetul de material filtrant este compus din particule cu granulometrie și proprietăți hidrodinamice extrem de diferite;

— raportul de galben a materialului solid are valori mari ($> 0,9$);

— rezistența mecanică a materialului solid este redusă, determinând tendința de obținere a porilor și variația în limite largi a porozității în timpul lucrului;

— materialul solid este extrem de compresibil, suprafață de contact variind în limite largi în timpul lucrului;

— materialul solid este caracterizat printr-o hidrofilicitate ridicată; apa adsorbătoare micorează diametrul aparent al porilor sprijinind frâcia de galben. Mărirea frâciei de galben reprezintă efectul cumulat al adsorbției superficiali a apelor, hidratării materialului proteic și formării de masă micelari hidratată ionică;

— caracteristicile hidrodinamice ale materialului solid se modifică defăvărărit și scădere vitezei de filtrare plănu la valori inaceptabile, practic utilizarea adjuvanților de filtrare care formează în cursul operației paturi micro-poros, micorind diametrul aparent al porilor (se implică mărind eficiența de colectare prin rezistență unor particule de diametru mai scăzut) și modificănd caracteristicile hidrodinamice ale materialului solid (mai scăzut) și modificănd în principal prin hidroabrazia porozității. Evaluarea calității adjuvanților de filtrare se face după caracteristicile lor de porozitate și compresibilitate.

Utilizarea lor industrială impune obținerea de efecte maxime cu consumuri minime, întrucât adjuvanții sint cumpărați în cantități importante de soluții ușile; de cele mai multe ori se utilizează una din următoarele scheme de lucru (sau o combinație de două scheme):

— pe materialul filtrant (până de filtru, hârtie etc.) se aplică un strat de adjuvant, prin patul filtrant astfel format se execută operația de filtrare. Metoda de remătare bune la împrejmarea soluțiilor diluate;

202

Prelucrarea mediilor de cultură în scopul isolării și purificării prod. de biosintează ... 157

— proprietăți chimice;

— stabilizarea față de diverse enzime;

— stabilitatea la acțiunea unor agenți chimici.

Pentru separarea produsului din mediile de biosintează se aplică, în general, următoarele metode:

— extracția cu solventi organici;

— separarea pe schimbători de ioni;

— chromatografie;

— adsorbția.

In industria de biosintează există însă metode de prelucrare integrală a mediului de cultură prin aplicarea diferitelor metode de uscare, produsul rezultat fiind utilizat ca stare. Acest mod de prelucrare a mediilor de biosintează este mult mai utilizat în tehnologia aditivilor furajeri (continând aminoacizi, enzime, vitamine).

Operează chimice cel mai des utilizate în biotecnologie enzimelor și aplicate industrial sunt: filtrarea, concentrarea, dezagregarea celulară și atomizarea.

7.1. FILTRAREA MEDIILOR DE BIOSINTEZĂ

Față de filtrarea substanelor chimice, filtrarea mediilor de biosintează ridică adesea probleme datorită compoziției chimice deosebit de complexe a mediilor și apariției materialului biologic (bacterii, virusi) care complică fenomenul.

Operația de filtrare a mediilor de biosintează este adeseori usoră prin utilizarea adjuvanților de filtrare care formează în cursul operației straturi micro-poros, micorind diametrul aparent al porilor și implică mărind eficiența de colectare prin rezistență unor particule de diametru mai scăzut. Utilizarea lor industrială conduce la mărirea vitezei de filtrare și reducerea consumurilor de materiale.

Ca mod de lucru se utilizează una din următoarele scheme :

— pe materialul filtrant (până de filtru, hârtie) se aplică un strat subțire de material adjuvant (prin filtrarea unei suspensii apoase de adjuvant). Prin paralel astfel format se execută operația de filtrare;

— adjuvantul se amestecă cu suspensie de filtrat, se execută filtrarea în regiunea primelor porțiuni de filtrat până la împrejmarea sa totală;

— inclusiv permanentă a stratului de adjuvant, cu ajutorul unor cupole speciale, astfel locul stratului de adjuvant de filtrare este menținut la o valoare optimă iar viteză de filtrare este menținută constantă. Această variantă este aplicată în cazul filtrelor rotative.

O variantă a operației de filtrare mult utilizată în biotecnologie este filtrarea sterilizată.

La prelucrarea suspensiilor se face mai întâi o prefiltrare grosieră, urmată de filtrare sterilizată propriu-zisă. Pentru filtrarea sterilizată se montez în susținătoare de filtrare sterilizată (fără sifon) cu un strat de filtru placic (din acrilic de calitate, azbest sau polimeri sintetici) cu diametru de 100 mm și grosimea de 10-15 mm. În următoarele 203

203

203

203

— adjuvantul se amestecă cu suspensia de filtrat; se execută filtrarea recirculată primei porțiuni de filtrat pînă la împreună sa totală. Metoda prezintă avantajul că pachetul filtrant se colamează lent — de obicei se utilizează în combinație cu primul procedeu;

— la utilizarea filtrelor rotative, lama de răcire a precipitatuilui se reglează și mai aproape de plana de filtru, grosimea patrunu de adjuvant de filtrare fiind astfel menținută la o valoare optimă predeterminată, iar viteza de filtrare menținută constantă pe întreg parcursul operației.

Pentru filtrarea sterilizată se montează în filtru plăci (din acetat de celuloză, arbec sau polimeri sintetici) cu diametru redus al porilor, executând apoi în mod normal operația de filtrare. La prelucrarea suspensiilor cu conținut ridicat de solide se execută înfiș o prefiltrare groasă urmată de filtrarea sterilizată propriu zisă.

4.3.2. Desagregarea celulelor de microorganisme

Punerea în libertate a complexului de substanțe continute în celulele microbioane, în vederea recuperării componentelor interesante, necesită desagregarea membranelor celulare semipermeabile și a peretelui ei protecțor. Astăzi operație trebuie efectuată în aşa fel încât modificarea proprietăților sale să fie minimă; se preferă procedele continuu la care valoarea timpului de contact între agentul destruyă și componenta labilă este redusă și poate fi exact controlată.

Procedele de desagregare ale celulelor microbioane se clasifică după natura agenților de desagregare utilizati în: procedee mecanice, procedee fizice ne-mecanice, procedee lîcice chimice și enzimatiche.

Procedee mecanice de desagregare celulară. Desagregarea celulelor se poate efectua în mori coloidale sau în mori vibratoare, menținând un anumit raport de microclară, pînă când dezagregarea celulelor microbioane este totală. Menținerea sistemului la o temperatură acceptabilă se efectuează prin circulația unei agenții de răcire.

Sisteme vibratoare. Sistemul utilizat este un vibrator electromagnetic conectat la un motor; camera pistolului conține o suspensie de celule microbioane și corpuri de micromărime (granule de binoxid de siliciu, sticlă, aluminiu etc.). Împrișind suspensie și frecvență de vibrație de 100–200 cicli/securda, dezagregarea celulelor microbioane este practic totală.

Diferite în principiu sunt sistemele de dezagregare ale celulelor microbioane prin presare (presă Hughes, presă French, presă X). Pasta de colule microbioane — ca și multă altă materie abrazivă — este forțată la presare cuprinse între 1 000–6 500 kg/cm² pînă cînd s-au făcut de mici dimensiuni; întregul sistem este ricat cu azot în sigillă.

Desagregarea celulelor de microorganisme prin procedee fizice, nemecanice. Desagregarea celulelor microbioane se poate efectua prin decomprimare, capătă, prin înghețare lentă (datorită sporirii volumului apelă la treocerea în stare solidă) sau prin soare compozit. Această din urmă metodă are avantajul unei acțiuni selectivități determinată treocerea în fază lichidă numai a unor din componentele sistemului.

Un procedeu desosbit de eficacă de aplicare a forțelor de forfecare care determină dezintegrarea celulelor de microorganisme este aplicarea de vibrații ultrasunice suspensiei de celule. Vibratiile – cu frecvențe de circa 20 000 Hz – determină fluctuații de presiune fizotite de formarea unor microbulle (cu diametru de pînă la 10 μ m), care oscilează rapid și implodează generind unde de presiune ($\sim 10^6$ atm), care oscilează rapid și împodobează celulele microbuluoare și în scopul de undele de soc generate de implozie. Celelalte microbuluoare și în scopul de undele de soc generate de implozie. Celelalte efecte ale vibrațiilor ultrasunice au de obicei efecte negative asupra compoziției lăbului și sistemului – temperaturile ridicate produse local determină inactivitate termică, iar radicalii liberi determinând modificările irreversibile a structurii chimice a speciilor moleculare prezente, deci inactivări ale enzimelor.

Echipamentele de dezagregare cuprind în principal patru subansamblu: a) generatorul electronic de vibrații ultrasunice; b) traductorul vibrațiilor ultrasunice în oscilații mecanice; c) zona de dezagregare celulară propriu-zisă și d) sistemul de îndepărțare a căldurii excesive generate în proces.

Vibrații ultrasunice determină, prin dezagregarea celulelor, eliberarea enzimelor caracteristice sistemelor biologice. Primele sunt puse în libertate enzimele citozine, iar următor, într-o anumită secvență, enzimele mitocondriale. Procesul dificultate în calea aplicației industriale a sistemelor ultrasunice de dezintegrare celulară este legată de îndepărțarea din sistem a căldurii.

Dezagregarea celulelor microbioane prin procedee chimice sau enzimatic. Componentele lipoproteice ale membranelor celulare sunt distruse, prin acțiunea degetenilor catiонici sau anionici, sau a solvenților organici, determinând treceea în fază lichidă a unor din componentele echipamentului enzimatic. Anumite legături chimice din structura membranelor celulare pot fi scindate prin acțiunea unei preparații enzimatiche.

Liniile celulare bacteriene pot fi înlătură prin adiția agentilor care interferă cu sinteza peretelui celular sau prin stăcâmpanie specifică al legăturilor α -1,4 dintre moleculele de N-acetylglucosamină și acidul N-acetilmuramică.

Apariția formelor L, caracterizate prin absența peretelui cellular poate fi inducăta în mediu de cultură prin adăugarea unor concentratii mici de penicilina, care inhibă incorporarea în peretele cellular a substanțelor care alcătuiesc un complex rezupinarător de rigiditatea peretelui cellular bacterian.

Lambadie și Hallie (1963) au obținut forme L de *Bacillus subtilis* prin enzimă, peretelul cellular cu lizozină (muramidază E.C.3.2.1.17). În prezent ENTA un număr de bacterii devin suscipțibile la acțiunea lizozină și pot să dezvoltă o rezistență la această substanță. Formele L au o mare sensibilitate la variațiile de presiune osmotice. Protoplastii și sferoplastii rezultăți prin enzimă, peretelul cellular se lizează din această cauză foarte ușor

4.3.3. Concentrarea mediilor de biosinteză

Concentrarea mediilor de biosinteză este asemănătoare în principiu cu operația de evaporație practicată în industria chimică – sistemele de calduri ale evaporatorilor fiind identice. Principalele desosbiiri sunt determinate de:

7.2. DEZAGREGAREA CELULELOR DE MICROORGANISME

Când substanțe biologic active care interesează și care s-au format în cursul procesului de biosinteză sunt intracelulare, este necesară distrugerea membranelor celulare semipermeabile și a peretelui protector, în vederea recuperării componentelor respective. Această operare se realizează prin procedee de dezagregare.

După natură agentul de dezagregare utilizat, procedeele de dezagregare ale celulelor microbioane se clasifică în:

- procedee mecanice;
- procedee fizice nemechanice;
- procedee chimice;
- procedee enzimatic.

Procedeele mecanice cuprind dezagregarea celulelor în mori coloidale sau în mori vîtretoare, menținînd un anumit raport de circulație, pînă la dezagregarea totală a celulelor microbioane, în timpul operațiilor de dezagregare mecanică are loc o creștere a temperaturii materialului biologic. Evitarea acestui fenomen și menținerea sistemului la o temperatură acceptabilă se efectuează prin circulația unui agent de răcire prin mantaua aparatului.

Dezagregarea celulelor de microorganisme prin procedee fizice, nemechanice, se poate efectua prin decompresie rapidă, prin înghetare lentă (datorită apariției volumului apă la trecerea în stare solidă) sau prin soc osmotice. Un procedeu desosbit de eficacă este aplicarea de vibrații ultrasunice suspensiiei de microbioane.

Dezagregarea celulelor microbioane prin procedee chimice cuprinde distrugerea componentelor lipoproteice ale membranelor celulare prin acțiunea degetenilor catiōnici sau anionici sau a solvenților organici, determinând treccerea în fază lichidă a unor din componente biologic active.

Dezagregarea celulelor microbioane poate fi efectuată și prin tratarea cu diferele preparații enzimatic. Astfel, liza celulelor bacteriene poate fi scuturată cu stăcâmpanie enzimatică specifică al legăturilor α -1,4 dintre moleculele de N-acetylglucosamină și acidul N-acetilmuramică.

Dezintegrația biologică enzimatică este una dintr-o serie mai vechi metode de obținere a omogenizatorul celulare. Astfel, este bine cunoscută descompunerea microbuluoare de *Micrococcus lysodeikticus* postea fi realizată cu suc pancreatic, iar a mușinelui muscular cu enzime proteolitice izolate din *Bacillus subtilis*.

Dezintegrația biologică a *E.coli* poate fi realizată cu bacteriofagi,

minate de termolabilitatea lichidelor biologice și de necesitatea utilizării de echipamente simple cu componente accesibile în vederea menținerii unei igiene perfecte.

Se utilizează adeseori evaporarea în vacuum care permite efectuarea operației la temperaturi relativ scăzute (25...50°C). Evaporarea în vacuum nu poate fi lăsată decât în unități industriale mari datorită destinderii vaporilor radicate de investiții (volum mare al instalației datorită destinderii vaporilor în vacuum, echipamente complexe de condensare, pompe de vid etc.) și de întreținere (verificări frecvente, control riguros al limbănărilor etc.). Se preferă uneori din această cauză sisteme de concentrare care protejează materialul biologic prin menținerea unui timp de contact redus cu agentul termic.

La concentrație moderată (pînă la 20...30%) a substanțelor cu masă moleculară ridicată (proteine, enzime, hormoni) se practică cu succes procedeele de concentrare atermică – ultrafiltrare și osmoza inversă.

Concentrare și purificare preparaților enzimatici prin ultrafiltrare și osmoza inversă. Ultrafiltrarea reprezintă procesul de separare a componentelor unei soluții datorită diferențelor de volum molecular în ajutorul unei membrane. Ultrafiltrarea reprezintă un procedeu ideal de separare și purificare a substanțelor biologic active, întrucât:

- a) permite efectuarea concentrării la temperaturi scăzute, mijlocind fenomenele de autodigerare și pierderea de activitate prin denaturare termică;
- b) nu necesită modificări de fază (evaporări, condensări);
- c) nu utilizează substanțe chimice;
- d) permite purificarea substanțelor biologic active prin îndepărtarea unor componente cu volum molecular inferior;
- e) tăria ionica și pH-ul soluției care se concentrează rămîn practic constante în timpul prelucrării.

Diagrama procesului de ultrafiltrare este dată în figura 4.31 în care C_F reprezintă concentrația substanței溶解 în soluția de alimentare, C_W concentrația substanței溶解 în soluție la suprafața membranăi semipermeabile, iar C_p concentrația substanței溶解 în permeat.

Accumularea de substanță în zona membranei semipermeabile constituie fenomenul denumit polarizare de concentratie (fig. 4.30) determinând uneori precipitarea sau gel care mărește rezistența la treceea fluxului de fluid.

Spre deosebirea stratului de gel, măreștează cantitatea de substanță transportată din masa de fluid spre membrană și la crearea unui echilibru dinamic cu cantitatea de substan-

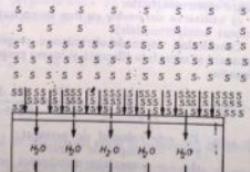


Fig. 4.30. Polarizarea de concentratie a substanțelor solubile reținute de membrana de ultrafiltrare.

Producerea multor de cultură în scopul isolării și purificării prod. de biosisteme

7.3. CONCENTRAREA MEDIILOR DE BIOSINTEZĂ A ENZIMELOR

Mediile de biosinteză se concentrează prin operații specifice industriei farmaceutice și alimentare. Se utilizează adeseori evaporarea în vacuum, care permite menținerea unei temperaturi scăzute (25...50°C).

In ultimul timp se practică cu succes procedeele de concentrare atermică, osmoza inversă.

Ultrafiltrarea reprezintă procesul de separare a componentelor unei soluții după diferențele de volum molecular cu ajutorul unei membrane. Ultrafiltrarea este un proces de separare și purificare a substanțelor biologic active, având următoarele avantaje:

- permite efectuarea concentrării la temperaturi scăzute, mijlocind fenomenele de autodigerare și pierderea de activitate prin denaturare termică;
- nu necesită modificări de fază (evaporări, condensări);
- nu utilizează substanțe chimice;
- permite purificarea soluțiilor biologic active prin îndepărtarea unor componente cu volum molecular inferior.

Cercetările privind introducerea proceselor cu membrane urmăresc, în general, stabilirea posibilității de utilizare eficientă a unor tipuri de membrane la concentrare și purificare produselor biologic active, în cadrul elaborării tehnologice de obținere a acestora.

Literatura de specialitate în acest domeniu cuprinde studii ample privind metodele proceselor de ultrafiltrare.

În ceea ce privește cercetările statelor de cercetare și dezvoltare se jin să limiteze performanțele utilizării membranelor în tehniciile de purificare:

- blocarea membranelor ("membrane fouling") prin adsorbție de solut, în special proteine;
- polarizarea de concentratie (gel polarizare).

Bazele teoretice ale explicării fenomenului de blocare a membranelor de desfibrare datorită proteinelor au fost puse de Turner și Hubble. El menționează, în ceea ce privește membranăre, un nivel al proteinelor asociate de membrană suprapusă unei izotome de saturare cu un maxim la 207 µg/cm², în condiții înălțării prin membrană, acestă concentrație crește pînă la o nouă valoare limită, independentă de flux, dar depindead de circulația tangențială a fluidului supus membranăi. Rezistența stratului de proteină adsorbate crește cu fluxul, grosimea stratului membranării și adsorbția prezintă un caracter reversibil cu regimul hidrostatic. Referitor la modelul gel-polarizării, se stabilește relația între fluxul transversal și timp precum și parametrii ce depind de condițiile de operare (concentrația membranării), diferența de presiune aplicată, coeficientul de permiabilitate și de presiunea osmotanică, difuzivitate.

Conform acestei clasificări enzimele sunt împărțite în șase mari clase, funcție de tipul reacției catalizate:

- 1 — oxidoreductase; 4 — liaze;
- 2 — transferase; 5 — izomeraze;
- 3 — hidrolaze; 6 — sintetaze.

Cand se împart în subclase și sub-subclase în funcție de unele detalii privind grupurile supuse transformării și natura cofactorilor implicați în reacția pe care o catalizează. Spre exemplu amiloglucoxidaza are codul E. C.3.2.1.3.

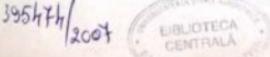
5.2. Criterii pentru selectarea microorganismelor și enzimelor utile

Numerărul preparaților enzimatici utilizate în scopuri practice a crescut în ultimul timp datorită marilor avantaje pe care le prezintă transformarea diferențelor substanțe. Una dintre sursele cele mai importante de enzime pentru obținerea preparaților enzimatici este reprezentată de microorganisme.

Microorganismele oferă mai multe avantaje față de sursele de enzime de origine animală sau vegetală, deoarece pot fi obținute în cantități mari pe medii de cultură ieftine și în instalații speciale. În acest fel cincinatarea de preparate enzimatici nu este limitată de lipșa materiei prime, iar prețul de cost la care se pot obține le face competitive cu preparații similare din alte surse. Preparațile enzimatici sunt utilizate în scopuri practice sau științifice pentru catalizarea diferitor reacții de hidroliză, oxidare, reducere, transfer (amiazare, deaminare, acilare, fosforilare, glicolilare, metilare, condensare etc.), decarbonylare, racemizare, izomerizare.

Pentru selectarea unui microorganism care să producă enzima sau sistemul enzymatic dorit, trebuie mai întâi să se testeze lucid microorganismele luate în lucru și să se stabilească substanța și dacă primele reacțiile de metabolism se află în reacția sau răsuflare care produce transformarea dorită a substanței. În cazul în care un microorganism îndeplinește aceste condiții, poate fi luat în lucru mai departe, selectarea efectuându-se după următoarele criterii:

- microorganismul să nu manifeste putere patogenă;
- să nu elaboreze endo-, exo-toxine, micotoxine (afatoxine);
- să nu ponde activitate antibiotică sau potential alergen;
- să producă cu precădere și în cantități mari enzima sau complexul enzymatic dorit; se preferă mutanțele constitutive nerepresibile prin produs final;
- să se dezvolte autotrof pe medii de cultură ieftine;
- să elaboreze enzime sau enzimale intracelulare sau extracelular conform utilitarului celor mai eficiente a preparațului enzimatic;



BIOTEHNOLOGIA ENZIMELOR

se prelucrează ușor. Materile prime folosite la fabricarea preparaților enzimatici de pot fi de natură vegetală, minerală sau microbionă. La plante, concentrații mari de enzime se pot întâlni în semințe, în boabe germinate, în fructe, frunze, rădăcini. La animale, enzimele se găsesc bine în cantități mari în diferite organe (rinichi, ficat, pancreas, mucoasa stomacală).

O sură foarte importantă de enzime utilizată frecvent pentru fabricarea preparaților enzimatici o formează microorganismele. Ele au mai multe avantaje față de sursele de enzime atât de origine vegetală cât și animală. Microorganismele se pot obține cu ușurință, în cantități mari, prin înmulțire în instalații speciale, pe medii de cultură ieftine. În acest fel, obținerea unor cantități mari de preparate enzimatici nu este limitată de lipsa sau de costurile materiei prime, ca în cazul enzimelor de origine animală. Ciclul de dezvoltare al microorganismelor este foarte scurt în raport cu ciclul de dezvoltare al animalelor și plantelor, iar medile de cultură pe care se cultivă microorganismele sunt, de regulă, subproduse agricole sau șiile industriilor alimentare.

Prima exploatare modernă a enzimelor de fermentație o datorăm lui Takanishi, care, în 1894, a cunoscut un succés un amestec enzimatic din orez fermentat numit "koji" bogat în amylază și care s-a vândut în Japonia ca un adaus digestiv de uz uman. Mai strâns și în legătură cu Statele Unite producția de "akadashiase".

La începutul secolului al XII-lea, Otto Rohm, în Germania, a descoperit că efectul de curățare a pielelor cu ajutorul excrementelor de căine și de porc se datorează enzimelor proteolitice pe care acestea le conțin. El a demonstrat ulterior că enzimile extrase din pastrăvul animal sunt mai bune decât excrementele și a arătat că acestea se pot obține și prin cultivarea fungilor în culuri de suprafață. Enzimile extrase din organismele superioare și-au găsit foarte devreme numeroase aplicații. De exemplu, studiile asupra fenomenului de cercuire la fabricarea berii a relevat importanța enzimelor din mală asupra mobilității glicidelor și proteinelor de laie domeniul. Efectul de filtrare a cămăi cu ajutorul plantei tropicale *Carica papaya* se determină prin activitatea proteolitică a sucului acesteia, astfel încât să se mențină pielea să devină special în acest sens. Alte enzime se extrag din diferite organe ale animalelor. Un exemplu de acest fel îl constituie triptamină cholinergică, care se extrage din pașnicul de porc. Alcooldehidrogenaza te extrage din ficatul de căpșu, iar catatina din ficatul de bovină. Servetele de enzime așa cum sunt cele folosite de la animalele domestiice par a fi mai economice fapt de posibilitatea cultivării de microorganisme și în momentul de fapt o parte din ceea ce pășupă pentru enzime este satisfăcut de aceste preparații enzimatici extrase din

In continuare se tratează dinamica biosintesei α -amilazei, utilizind tulpini de *Bacillus subtilis*, după procesul submers, discontinuu și continuu. Procesul cultural submers se va generaliza în prezent datorită faptului că la același capacitate de producție necesită o suprafață construită mult mai mică, adică mai simplă și o exploatare mai ușoară.

Optimizarea se regăsește și la jumătate de culturi cu un conținut ridicat în α -amilază depinde de starea fiziologică a microorganismului utilizat ca inocul și de parametrii de biosintează: temperatură, pH, agitare, rată de aerare, durată culturală, caracteristicile fizico-chimice ale mediului nutritiv.

5.3.1.1. Pentru optimizarea biosintesei α -amilazei se utilizează de *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis este un germen GRAM +, sporegen, strict aerob, saprofit, posedând un prezentat plenar metamorfism. Sporul este termoresistent (rezistă 40 minute la 95°C ATP sau chiar până la 120°C căldură ușoară). Temperatura optimă de dezvoltare se situează între 28 - 40°C, iar pH optim este 6 - 8,0. Extracția la hidroliză este 2-DNA, F, AL, GA, SP50, PBSL. Tulpinile de *Bacillus subtilis* prezintă fenomenul de disociere $R \rightarrow S, P, M$, în anumite condiții. Forma R tipică este activă cu potențial enzimatic ridicat, în timp ce formele S, P, M sunt slab active sau inactivă (fig. 5.26) (U. N. de K. L. et al., 1954; B. B. Matovska, 1978, 1979). Formele S, P, M se pot disocii între ei și după vîrteză și intensitatea sporulari, fiind posibile și forme variante ale sporelor (Hayward, 1946).

Din aceste disociere $R \rightarrow S, P, M$ este însoțită de pierderea capacitații de producție sau eliberez procedeu de limitare a variaabilității tulpinilor de *Bacillus subtilis* (S. I. Irm a n. B. B. Matovska, 1970). Modulațiile de limitare a variaabilității și de stabilizare genetică sunt: selecția coloniilor de tip R înalt productive, menținerea culturăi proveniente din arcește următoare, filtrația și conservarea culturilor stoc pe 4°C, utilizarea a fiecare sărja a unui inocul preparat dintr-o fiabilă hidroliză, evitarea replicărilor repeatate.

Potrivit unui inocul de calitate și-a obținut optimizarea cu regularitate a producției ridicate de α -amilază.

5.3.1.2. Biosinteză α -amilază în culturile submerse

Biosintezăa substanțelor biologic active este corelată cu starea fiziolologică în care se află microorganismul în timpul fazelor ciclului său biologic.

Trofofază în care căile amfibole funcționează, preponderent energetic (respirație) și plastic (acumulare de biomă) corespund metabolismului primar.

Ideofază este starea fiziolologică în care căile metabolismului primar sunt consumate la biosintetizarea produselor secundare metabolice, enzime, antibiotice etc.

Fig. 5.26. Illustrație a existenței de către *Bacillus subtilis* a formelor ale potențialului de disociere în cultura submersă:

1 - formă R ; 2 - formă S ; 3 - formă M .

250

Forma R este activă și poate produce α -amilază.

Forma S este inactivă și nu poate produce α -amilază.

Forma M este inactivă și nu poate produce α -amilază.

Forma R este activă și poate produce α -amilază.

Forma S este inactivă și nu poate produce α -amilază.

Forma M este inactivă și nu poate produce α -amilază.

Forma R este activă și poate produce α -amilază.

Forma S este inactivă și nu poate produce α -amilază.

Forma M este inactivă și nu poate produce α -amilază.

BIOTEHNOLOGIA ENZIMELOR

Diferența dintre α -amilaza produse de *Bacillus amyloliquefaciens* și cea produsă de *B. licheniformis* constă în compozitia diferită a hidrolizatului său amion obținut ca scăun enzime. Astfel, primul conține maltohexoze drept componente majore, iar în al doilea caz se obține un amestec de maltohexoze și maltose.

În mod similară, în funcție de specia bacteriană utilizată în procesul de hidroliză, compozitia în oligozahără și produsul de reacție este diferită, deși, în general, gradul de hidroliză calculat prin determinarea cantității de glucide reducătoare obținute în urma hidrolizei enzimatică raportează la cantitatea totală de sucre (amioze) utilizat este aproximativ același (20-25%).

În 1952, Fogerty a efectuat o recenzie completă a enzimelor microbiene care hidrolizează amioze (tabelul 12).

5.2.1.2. Înfluența etapelor de cultivare a microorganismelor asupra biosintezei α -amilazei

Când tulpina productoare este cultivată în sistem discontinuu, enzima este produsă în mod normal dacă și atinge fază maximă de creștere și începe fază staționară. Sunt posibile diferențe între prima și a doua fază de sporulare cu schimbările fiziologice. Să constată că, în timpul biosintezei enzimice, are loc o apresie prin catabolit, astfel încât nivelul de producție a enzimelor este limitat de concentrația sursei de carbon. În 1975, Seijo și Yamamoto au demonstrat inducerea simbiotică existind de către amionii concomitent cu reprezia prin catabolit la *B. licheniformis*. El au selectat mutanți rezistenți la reprezia prin catabolit. În 1984, Virtanen și colaboratorii săi au găsit că producția α -amilazei în sistem continuu este proporțională cu vîrsta de creștere și este reprezentată de concentrația în glucide redoxidabile.

În final, majoritatea autori au acceptat ideea că biosinteza α -amilazelor se face în sfârșit faza logistică, înainte de sfârșirea fazei staționare.

Producția α -amilazelor, bazată pe utilizarea tulpinii de *Bacillus subtilis* este influențată de particularitățile micro-fiziologice condate cu potențialul productiv al tulpinii. Tulpinile de *Bacillus subtilis* prezintă fenomenul de disociere $R \rightarrow S, P, M$ în anumite condiții. Forma R tipică este activă cu potențial enzimatic ridicat, în timp ce formele S, P, M sunt slab active sau inactice. Aceasta impune o limitare a variațiilor, prin selecția permanentă a coloniilor de tip R înalt productive, evitarea replicărilor și utilizarea de inocul preparat de fiecare dată din cultura noastră.

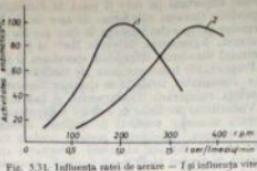
Dinamica numărului de spori-sărieni în culturi submerse, în sistem discontinuu, este reprezentată în fig. 12.3, 12.4 și 12.5.

transfer de masă al oxigenului cătă bun. Aerul sterilizat în prealabil se insuflă său și încă suprapresiunea pentru prevenirea contaminației.

Cinchtele totale de oxigen în timpul biosintetizei α -amililazei au fost determinate pentru *B. subtilis* NRRL-B 3411 și estimată la ≈ 120 mMol $_2$ /h $^{-1}$ (Heineken 1971), iar pentru *B. subtilis* NCIB-6649 la ≈ 18 mMol $_2$ /h $^{-1}$ (Gard et al. 1971-Kjaer et al. 1973), demontrând mari variații ale necesarului de oxigen pentru tulpini diferenți ale același gen.

În funcție de aerare și viteza de agitare este arătată în figura 5.31,

FIGURA 5.31. Înfluența vitezei de agitare asupra biosintetizei α -amililazei.



Media de cultură utilizată pentru biosinteză enzimelor trebuie să conțină în diverse raporturi optimă surse de carbon și surse de azot care pot juca rol de inducatori ai enzimelor, precursori, cofactori și microelemente.

Producția de enzime a unei tulpini variază mult în funcție de mediu utilizat. *B. subtilis* NRRL-B 3411 produce considerabil mai multă protează neutră decât protează alcalină sau α -amililază, dar cind este cultivat pe un mediu de făină de pestă, producția de protează neutră este redusă în timp ce producția de protează alcalină este reîndreptată.

Mecanismul de inducție ale biosintetizei α -amililaze pe mediu sintetică pară fi identic și pentru medii naturale, totuși activitatea amilolitică maximă se obține pe medii naturale conținând amidon și extract de porumb.

Producția α -amililazei este puternicădusă în prezența amidonului în mediu de cultură și este substratul natural al ei. Maltoza, lactoza și galactoză favorizează dezvoltarea și umflarea α -amililazei. Prezența glucozii în mediu de cultură are un efect puternic repressor, inhibând parțial sau total biosintiza α -amililazei.

Biosinteta este inhibată de anacarbobiul și de substanțele care decuplează procesul de fosforilare oxidativă, (2, 4-dinitrofenol). Pe lângă surse de carbon care este și inducator specific pentru α -amililază, surse de azot are o importanță deosebită sub raport cantitativ și calitativ.

Să pot utiliza ca surse de azot ingrediente naturale ca: gău de floarea soarelui, grâu de soia, extract de porumb. *B. subtilis* este capabil să utilizeze proteinile, amoniu și chiar azotul amoniacal. Utilizarea sămânților acidului azotos și sănse depinde de capacitatea fiecărui tulpină de a reduce nitratul și nitritul pînă la NH_4^+ .

S-a observat că mediu care conține ca ingrediente majore amidon și fosfați de amoniu induce cel mai puternic biosintetă enzimelor amilolitice și proteolitice. Caracterul puternic inductor al ionilor amoniu și calciu s-ar dată

BIOTECHNOLOGIA ENZIMELOR

azotenu, și-o clor fragmenț de ADN din *B. subtilis* sau din *B. amyloliquefaciens* și s-a utilizat pentru mărirea cantității de α -amililază secretată.

In general, genul *Bacillus* produce α -amililază, dar s-a găsit o enzimă din *B. stearothermophilus* care acionează mai mult ca β -amililază decât ca o α -amililază.

12.2.1.5. Compoziția mediului și parametrii de biosinteză

Biosinteta α -amililazei este influențată de compoziția mediului nutritiv și de condițiile de cultură a microorganismului (temperatură, pH, durata fermentației). Ca sură de carbon se pot utiliza diverse varietăți de amidon (tabelul 12.4). Cele mai bune rezultate se obțin în cazul utilizării glicogenului și a maltozei. Majoritatea sursei de azot, utilizate, distrează dihidratază, maltoza este utilizată, dar rezultatele sunt de cinci ori mai slabe decât în cazul utilizării glicogenului ca sură de carbon. Dacă se utilizează monozaharide, se obțin cantități foarte mici de α -amililază.

Sursa de azot folosită sunt universale, săruri de amoniu, aminoacizi, caseină. Pentru *B. coagulans* indică un mediu de cultură deschisă față de celelalte. De asemenea, pentru *B.licheniformis* s-a găsit că 3 vitamine și 7 aminoacizi sunt necesare pentru producția α -amililazei în condiții optime. Biosinteta de enzime a unei tulpini variază mult în funcție de mediu utilizat. De exemplu, o tulpină de *B. subtilis* produce mai multă protează decât α -amililază, dacă este cultivată pe un mediu cu făină de porumb sau prăjă de soia. Dacă se folosește un mediu pe bază de amidon, atunci se obține biosinteta α -amililazei. Dacă în mediu este prezentă glucosa, acesta are un efect puternic repressor, inhibând parțial sau total biosintiza α -amililazei.

În biosinteta amilolitice și proteazelor un rol important îl au ionii de calciu și amoniu, datorită implicării lor în sinteza acidului dipicolinic, intermediar în biosinteta acelor enzime. Ioni de calciu și, de asemenea, un rol important în stabilizarea enzimelor.

În ceea ce privește temperatura de cultură, aceasta variază de la o specie la alta, fiind în general cuprinsă între 30 și 37°C pentru *B. subtilis* și între 50 și 65°C pentru *B. coagulans* și *B. stearothermophilus* (tabelul 12.4).

Pentru unele tulpini produtrice de amililaze (tabelul 12.4), pH-ul optim variază între 6,0 și 7,5. Această poziție îi menține constanțe pe toată durata biosintetăi. Prezența proteinelor în mediu îmbunătățește capacitatea de temperare a mediului și îi-i se menține relativ constant.

Biosinteta α -amililaze este un proces intens aerob, iar oxigenul insuflat odată cu aerul sterilizat nu poate fi utilizat direct în fază gazată, ci numai ca oxigen din aerul sterilizat să treacă prin membranele celulare și să ajungă la fază.

Necesitatea de oxigen subțiri depinde de microorganism și mai ales de fază

de dezvoltare în care se află acesta, intensitatea maximă de respirație situându-se în

rolului important pe care îl joacă în biosinteză acidului dipicolinic. Acidul dipicolinic (present sub formă de sare de Ca în spori), induce la rindul său formarea proteoglycană moment în care are loc excreția maximă a α -amilazei, protează. În același moment de excreție și Ca^{2+} în concentrații oligodinamice interacționează, stimulând dezvoltarea și stabilizarea activității enzimei. Proprietățile fizico-chimice ale mediului de cultură, care prezintă interes, sunt: viscozitatea, tendința de spumare, capacitatea de filtrare, ușă respirație, rezistență la căldură, influențând consumul de energie necesar agitației mecanice, tendința de spumare, consumul de antispușant, capacitatea tamponă. Substanțele proteină conferă mediului de cultură o capacitate tamponă ridicată, excludând necesitatea corecțării pH-ului la valoarea optima pentru creștere. Creșterea viscozității mediului de cultură are optima în timpul biosintetizei. Creșterea viscozității mediului de cultură are ca efect o scădere accentuată a ratelor transferului de oxigen, producând perturbări importante ale procesului de biosinteză în condițiile utilizării găsim aerului.

Viteză de filtrare a mediilor de cultură după biosinteză enzimelor este un factor important în fazile de prelucrare pentru obținerea preparaților enzimatici purificați.

Inhalarea gazelor recuperate este condiționată de compoziția mediului de incubație.

Enzimele recuperate din mediul contînind făină de pestă-cereale au activitate specifică foarte bună de coagulare, gălăcioasă, brun închisă, le timp ce enzimele obținute din mediul contînind făină de soia-amidon sunt ușoare, pufoase, de culoare deschisă și activitatea specifică mai mică.

În figura 12.2 este redată schema teoretică a biosintetizei a complexelor enzimatici după prelucrarea culorii și de prelucrare a mediilor de cultură pentru prepararea parțială a preparaților enzimatici.

În următorul capitol se studiază dinamica biosintetizei α -amilazei cu culpieni de *B. subtilis* în culori submersă continuă, în condiții chemoestatică (Fabian 1968, Fenel 1972, Pašlarov 1977).

În condiții chemoestatică la viteză ale fluxului de diluție cuprinse între $0,03 - 0,15 \text{ h}^{-1}$, activitatea amilazei se menține un timp care variază în funcție de scăderea pînă la disperșiile pe parcursul experimentei.

Schimbările activității α -amilazei și proteazăi în condițiile cultivării continuu comparațiv cu reacțiorile în sisteme discontinu sunt semnalată de o serie de cercetători (Fabian 1970, Fenel 1972, Pašlarov 1977). Culorile continută sau realizată pe mediul sintetic și naturală în bioreactore de capacitate utilă de $0,8 - 1,9 \text{ m}^3$ la 30°C , viteză de agitare 800 r.p.m. și o rată de aerare de 1 V sec^{-1} V sec $^{-1}$, viteză de agitare 800 r.p.m. și o rată de aerare de 1 V sec^{-1} V sec $^{-1}$, viteză de agitare 800 r.p.m. și o rată de aerare de $0,15 \text{ h}^{-1}$ se observă că schimbările mai lentă a activității α -amilazei comparațiv cu viteză fluxului raportă cu $0,15 \text{ h}^{-1}$.

După "24 ore" activitatea amilazei scade cu $0,15 \text{ h}^{-1}$. La aceeași nivel lucru activitatea amilazei scade pînă la 10 U/ml și se menține observat la o viteză scăzută a ratei de diluție, egală cu $0,05 \text{ h}^{-1}$. La o astfel de viteză a fluxului, activitatea α -amilazei scade de la $22,5$ pînă la $15,75 \text{ U/ml}$ în 5 zile de la inițierea procesului.

254

Enzime amilozice

tempul fazei logaritmice. Cantitatea de oxigen este cu atât mai mare cu cât durata de generație este mai mică (fig. 12.6).

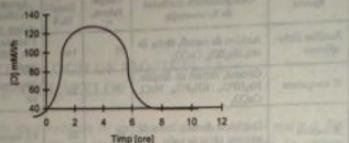


Fig.12.6. Variatia concentratiei de O_2 dizolvat pe parcursul biosintetizei.

Din acest motiv, bioreactorile sunt echipate cu sisteme de agitare eficiente pentru a asigura un transfer de masă al oxigenului cât mai bun. Aerul sterilizat în prealabil se instala sub o ușoră presiune pentru prevenirea contaminărilor.

Pentru boalația α -amilazei necesar de aer este:

$$120 \text{ mM}^3/\text{h} = 0,0224 \text{ l}/\text{h} = 1,44 \text{ l}/\text{h}$$

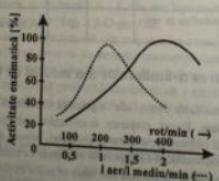


Fig.12.7. Influenta agitării și a debitului de aer asupra biosintetizei α -amilazei cu *B. subtilis*.

Proprietățile fizico-chimice ale mediului de cultură, care influențează biosinteză α -amilazei, sunt: viscozitatea, tendința de spumare. Viscozitatea influențează consumul de energie necesar agitării. Creșterea viscozității mediului de cultură are ca efect scăderea transferului de oxigen și diminuarea biosintetizei α -amilazei.

5.6.4. Substratul și mecanismele atacului enzimatic

Substratul natural al celulozei este celuloza. Ea constituie componente principale a peretilor celulelor vegetale. Se găsește adesea în plante sub formă de fibre.

Termenul de celuloză nu desemnează un compus unitar, datorită multor variații și gradul de polimerizare ai diferitelor celule, ci o categorie de substanțe cu molecule construite după același principiu variind considerabil prin mărimea lor. Celuloza nativă este într-un amestec cu cantități variabile de materii străine, menținute ca: hemiceluloza, lignina, rășini, lipide, substanțe minereale.

Metoda convențională pentru controlul conținutului în celuloză în celiuloză cu grad de polimerizare mare constă în tratarea cu NaOH soluție 17,2% pînă la îmbătrânește. Partea insolubilă din numește α -celuloză și are grade de polimerizare mai mari de 100; din soluția alcătuită prin precipitare cu acid acetic rezultă β -celuloza un hemiceluloză cu $n = 10 \dots 100$, iar în soluție rămîne γ -celuloza un amestec de oligosugăraze cu $n < 10$.

Pentru hidroliza cu acid clorhidric se formează celodextrina (celotetrazoa, celotrizoa, celobioza) și glucoza. Puterea rotatoare mică a celodextrinelor și puterea și viteza mică de hidroliză demonstrează că resturile de glucoza care le compun sunt legate β -glucozide.

Pentru urmări celuloza este compusă din macromolecule filiforme, în care resturile de D-glucopirană sint unite β -glucozidice, în pozițiile 1,4, prin atomi de oxigen și sint rotite unul față de altul cu 180° .

Macromoleculele celulozei sint catene lineare foarte lungi neramificate și neclărite rezultate printr-o reacție de policondensare a dizaharidelui celuloză.

În spectrul de difracție cu raze X, cu tot aspectul ei amorf, celuloza se comportă ca o substanță cristalină.

Macromoleculele de celuloză sint ajigate paralel, prin legătură de H între grupurile OH foarte numeroase, numai în anumite regiuni denumite cristalite, în altele regiuni macromoleculele au o apărare amorfă, neregulată lânsă spății și la hidroliza enzimatice a fibrelor este mai mare.

Mai multe cristale (numite și microfibriile sau miclele cu $O \approx 200 \text{ \AA}$) formează o fibră. Mai multe fibrele formează o fibă.

Gradul de polimerizare al celulozei native este de cca peste 3 000 la fibrele de mătăs, rășini.

În prezent, nu există încă o reprezentare unitară asupra modului și acțiunii

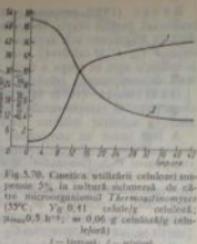


Fig. 5.70. Cinetica hidrolizei celulozei amorfă și a celulozei naturale de către hidroliză cu acid clorhidric ($T = 60^\circ\text{C}$, $p = 0,1\text{ atm}$, celuloză amorfă, $\alpha_{\text{ini}} = 0,5 \text{ h}^{-1}$; și 0,05 g celuloză și celuloză naturală).

Enzime celulozolitice

Tabelul 13.1

Bacterii termofile	Clostridium thermocellum
Bacterii mezofile	<i>Cellvirobacter fulgurans</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Ruminococcus sp.</i> <i>Cellulomonas sp.</i>

Bacteriile celulozolitice, atât Gram-positive cât și Gram-negative, includ specii aerobe (din genul *Pseudomonas*), facultativ anaerobe (din genul *Cellulomonas*) și strict anaerobe (din genul *Clostridium*).

Fungi. În timpul celui de-al doilea război mondial, Armata Statelor Unite ale Americii a suferit pierderi severe ale echipajamentului și uniformelor datorită atacului fungii în climatul cald și umed din Pacificul de Sud. Fungii care au contribuit la acest dezastru au fost recolatați și s-a alcătuit o colecție, din care s-a izolat și s-a caracterizat *Trichoderma Reesei* (Reese și Mandels, 1984). Tulipinile cunoscute sub nume populară (de fapt provenite din *Trichoderma viride*) constituie muceagaiul cel mai studiat și probabil cel mai bun pentru biosinteză întrugul sistem enzimatic celulozolitic. Cu toate acestea, se va exemplifica și cu alte căpătănești de fungi care au fost selecționate de diferi cercetători cu scopul declarat de a obține buni producători de celulaze: *Trichoderma koningii*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium verruculosum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* etc.

13.2. HIDROLIZA ENZIMATICĂ A CELULOZEI UTILIZÂND PREPARATE CELULOZOLITICE DE ORIGINE MICROBIOLOGICĂ

Substratul natural al celulazelor este celuloza. Ea constituie componenta principală a peretilor celulelor vegetale. Se găsește adesea în plante sub formă de fibre. Fibra de celuloză este constituită din diferite straturi succesive ale căror proprietăți fizico-chimice și mecanice conferă fibrei funcționalitatea sa specifică.

Din punct de vedere chimic, fibra vegetală cuprinde trei constituenți principali – celuloza, hemiceluloza și lignina.

Celuloza. Este un polimer insolubil, liniar, format (alcătuit) din unități de glucoză legate între ele prin legături de tip β -1,4. Gradul de polimerizare este de