

**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 indiciilor de plagiat prin fișa suspiciunii inclusă în decizie.

Fișa suspiciunii de plagiat / Sheet of plagiarism's suspicion	
Opera suspicionată (OS) Suspicious work	Opera autentică (OA) Authentic work
OS	JURCOANE, S. <i>Biotehnologii – Fundamente, Bioreactoare. Enzime</i> . București: Ed.Teh-nică. 2000.
OA	ZĂRNEA, G. MENCINICOPSCI, G. și BRĂGAREA, S. <i>Bioingineria preparatelor enzima-tice 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. Notăția „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.	✓
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.	✓
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 prefețe 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 trimitere 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. Piesa de creație presupune în mod necesar o formă de exprimare specifică unei persoane. Piesa de creație se poate asocia cu întreaga operă autentică sau cu o parte a acesteia...”

cu care se poate face identificarea operei plagiata sau suspicioane de plagiat³:

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

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

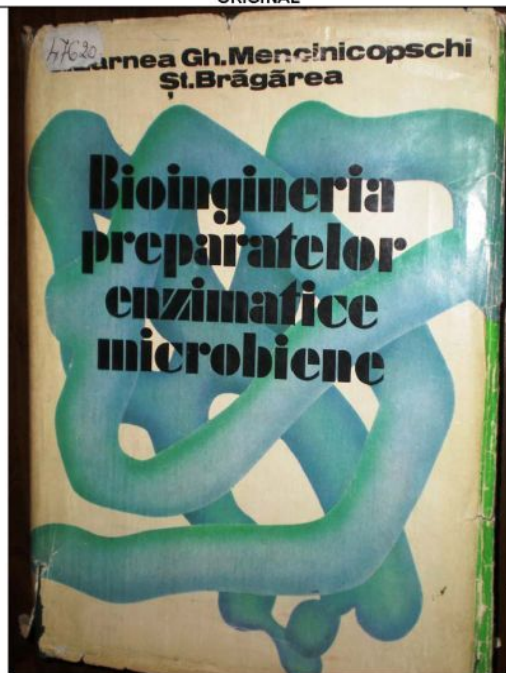
¹ Legea nr. 206/2004 privind buna conduită în cercetarea științifică, dezvoltarea tehnologică și inovare, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 505 din 4 iunie 2004

² ISOC, D. Ghid de acțiune împotriva plagiatului: bună-conduită, prevenire, combatere. Cluj-Napoca: Ecou Transilvan, 2012.

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

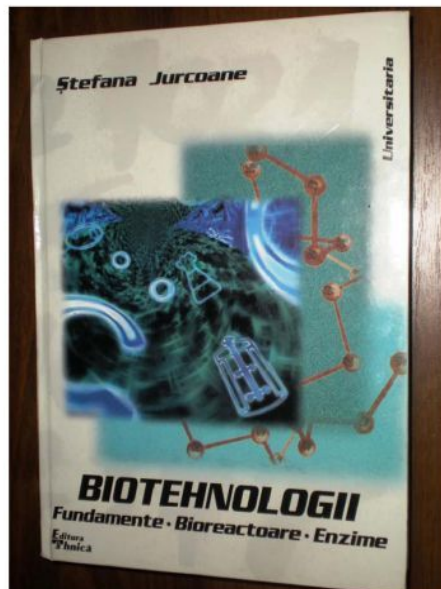
Zarnea, G., Mencinicopschi, Gh., Bragarea, St., Bioingineria preparatelor enzimatic microbiene, Ed. Tehnica, Bucuresti, 1980

ORIGINAL



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

COPIE



3. Biosinteza industrială a enzimelor

În ultima vreme obținerea directă a metabolitelor și utilizarea acestor produse biotecnologice de microorganismelor suscită cu prioritate interesul specialiștilor din domeniul de mare importanță economică.

Produse ca preparate enzimatice, antibiotice, vitamine, aminoacizi, acizi organici, etanol, proteine microbiene (S.C.F., - P.O.P.) se obțin prin strînsa colaborare între microbiologie-biochimie cu ingineria chimică, tehnologia și construcția de aparate. Necesitatea aplicării metodelor microbiologice la activitatea industrială pentru fabricarea substanțelor menționate a condus la apariția și dezvoltarea unui nou domeniu, denumit de dinamic, acela al biotehnologiei și biotehnologiei.

Biotehnologia producerii preparatelor enzimatice se bazează pe principiul cultivării microorganismelor în instalații industriale speciale, asigurându-se producătorilor condiții optime de creștere, dezvoltare și biosinteză a metabolitelor dorite.

Formarea produselor metabolice este corelată cu anumite faze de dezvoltare a microorganismelor. Se impune deci înlocuirea conducerii și reglării creșterii și dezvoltării microorganismelor producătoare, pentru a determina formarea selectivă a anumitor clase metabolice pentru acumularea preparatelor chimice, tehnice sau medicinale dorite. Aceasta face ca în comparație cu tehnica tradițională de muncă și control.

3.1. Etapele elaborării tehnologiilor de biosinteză a enzimelor

Elaborarea și industrializarea tehnologiilor de biosinteză a enzimelor se realizează parcurgând o serie de faze necesare conținut în cercetări la nivel de laborator, stație pilot, stație industrială, unitate industrială de producție. În cadrul acestor faze se desoselesc mai multe trepte de transpunere a biotehnologiei în producție (fig. 3.1.).

5 ETAPELE UNUI PROCES BIOTEHNOLOGIC

Elaborarea și industrializarea unei tehnologii de biosinteză presupune parcurgerea mai multor faze conținut în cercetări la nivel de: laborator, pilot și industrial. Aceste cercetări permit transpunerea procedurii 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 prezentate în cele ce urmează.

Izolarea și selecția. Se izolează și se selectează un mare număr de microorganisme cunoscute din literatura de specialitate ca producători ai compusului ce urmează a fi biosintetizat. Tehnicile utilizate în acest scop sunt specifice pentru fiecare microorganism și sunt realizate de microbiologi cu pregătire corespunzătoare. Manualele de specialitate indică mai frecvent, pentru izolarea și selecția microorganismelor, metode ca: tehnica diluțiilor și tehnica granulelor de sol.

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

De obicei, microorganismele sunt cultivate pe plăci Petri, pe medii solidificate în agar-agar. Testele de identificare a compusului care interesează pot fi calitative sau cantitative. În cazul enzimelor, de exemplu, se aplică, de obicei, metode de identificare calitativă prin includerea în mediul solid, pe care se cultivă

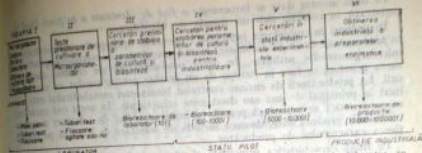


Fig. 31. Procesul tehnologic de biosinteză a enzimelor de la faza de laborator, în producție.

3.1. Faza de laborator

Procesul de bază din tehnologia de biosinteză a enzimelor este proces microbiologic.

Cercetările încep prin izolarea din diferite habitate a unui mare număr de microorganisme cunoscute sau necunoscute, din care se izolează și se purifică culturile de microorganisme. Tehnicile 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. Deosebi sunt create condiții selective de cultură a microorganismelor pe medii solide sau lichide conținând anumite principii cu ajutorul cărora se pot evidenția unele caracteristici fiziologice. După etapa de izolare și realizare a culturilor pure prin tehnici directe de micro-manipulare sau indirecte (epurarea apei, diluții etc.), se trece la trierea (screening) tulpinilor luate în lucru după criterii calitative și cantitative, conform scopului urmărit. Drept teste calitative pentru izolarea tulpinilor celor mai productive pentru alfaamilază se utilizează metoda amilolastică, pentru izolarea producătorilor de protează metoda Frazier etc. Principiul acestor teste calitative constă în cultivarea microorganismelor în plăci Petri pe medii solidificate cu agar-agar, conținând substratul natural al enzimelor dorite. După dezvoltarea coloniilor izolate, enzimele difuzează în gelul de agar-agar atâcând substratul inclus în mediu. Interpretarea rezultatelor se face după adăugarea unui reactiv specific substratului (amidon-Lugol ca substrat reactiv TCA, Frazier) prin apariția unei zone de hidroliză în jurul coloniilor. Cu cât această zonă este mai extinsă, cu atât microorganismul respectiv este mai bun producător.

Testele cantitative se efectuează prin determinarea precisă a activității enzimice a extractelor sau lichidelor de biosinteză prin metode spectrometrice, de fluorescență, titrimetrice, polarimetrice, manometrice. În urma acestor teste se rețin numai celele tulpini care sînt apoi cercetate în vederea identificării și caracterizării după criterii morfologice, biochimice, fiziologice, imunologice, virulență-patogenitate, sensibilitate la fagi, toxicologie etc.

genetic. Pe de altă parte, procesul de creștere depinde în evoluția sa de natura substratelor nutritive din mediu și de aprovizionarea continuă cu elemente de sinteză.

Crescerea bacteriilor se realizează prin depunerea unei sau tridimensionale a celulei cu energie necesară reacțiilor endotermice de sinteză.

Măsurarea volumului celular se face la bacterii nu numai prin sinteza de substanță organică, ci și prin sporirea consecutivă accentuată a conținutului lor de apă. Astfel la *Protos vulgaris*, unei creșteri în volum de cinci ori, îi corespunde o creștere de numai două ori.

Creșterea și dezvoltarea organismelor nu are loc indefinit, ci se întrerupe la un moment dat, datorită producerii diviziunii celulare. Diferite ipoteze au încercat să explice mecanismul care produce diviziunea celulară. Unele presupun existența unui factor genetic sau a unui factor fiziologic care determină diviziunea celulară. Altele presupun existența unui factor fiziologic care determină diviziunea celulară. Altele presupun existența unui factor fiziologic care determină diviziunea celulară.

[illegible]

În cadrul proceselor biotehnologice studiul creșterii și multiplicării microorganismelor productoare are o importanță practică deosebită pentru:

La începutul de organizare pluricelulară, la care multiplicarea celulelor are ca rezultat creșterea numărului de celule, organismele unicelulare, numite *haptonturi* (*haptonți*) se realizează pe două ci, care cuprind: 1. Multiplicarea celulelor prin diviziune (*mitoză*), care este specifică organismelor unicelulare, și 2. Multiplicarea celulelor prin diviziune asexuală (*mitoză*), care este specifică organismelor pluricelulare. În acest proces, celulele se divid în două celule fiice, care pot fi aproximativ egale sau diferite în mărime și funcție. Acest proces este cunoscut sub numele de diviziune asexuală și este o formă simplă de reproducere. În organismele pluricelulare, diviziunea asexuală este o modalitate de reproducere care implică diviziunea unei singure celule în două celule fiice, care pot fi aproximativ egale sau diferite în mărime și funcție. Acest proces este cunoscut sub numele de diviziune asexuală și este o formă simplă de reproducere.

...caracteristică bacteriilor aflate în fază R.

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 celulari, pornind de la substanțe nutritive simple aflate în mediul de cultură (Gh. Zarnea).

Procesul de creștere a microorganismelor este controlat genetic. Pe de altă parte, acesta depinde în evoluția sa și de natura și concentrația substanțelor nutritive. În media, precum și de asigurarea cu energia necesară reacțiilor de sinteză. Creșterea bacterelor se realizează prin depunerea unui sau tridimensională de substanță nouă, care se determină mărirea celei bacteriene în sensul unei dimensiuni ei sau în sensul celor trei dimensiuni. Mărirea volumului celulei se face într-un singur punct de creștere organică care și prin mărirea conținutului în apă. Creșterea microorganismelor nu are loc indefinit, ci interzice la un moment dat, când condițiile de mediu sunt deficiente.

Activitatea normală a microorganismelor este condiționată de existența substanțelor nutritive și eliminarea catalizatorilor. În cursul creșterii celulei, raportul suprafețe/volum se modifică datorită faptului că, în timp ce suprafața crește cu o dimensiune relativă a suprafeței celulei fiind proporțională cu pătratul rădăcinii ei, atunci când disproporția dintre suprafață și volum atinge un anumit raport se produce diviziunea celulară.

În cadrul proceselor biotehnologice, studiul creșterii și multiplicării microorganismelor productoare are o importanță deosebită pentru eficiența tehnologiilor industriale. Spre deosebire de organisme pluricelulare, la care multiplicarea celulelor duce la mărirea taiei individuale, la toate celelalte organisme unicelulare, ea are ca rezultat creșterea numărului de indivizi. Viteza de multiplicare

... a moltiplicare a

Viata de multiplicare a bacteriilor este excepțional de mare. **Durata unei generații** — intervalul de timp dintre două diviziuni succesive — este tipică pentru fiecare specie, dar poate varia, la aceeași specie în funcție de condițiile de mediu, fiind în general cuprinsă în limitele a 20—30 de minute. Numeroșii cercetători apreciază capacitatea de creștere și multiplicare a bacteriilor prin „**tempul de generație**” definit ca intervalul de timp necesar pentru dublarea numărului celulelor.

Azotomicetele, bacterii gram-pozitive tranzitoriu sau constant filamentoase și ramificate, deci eubacterii miceliene, se multiplică prin diviziune directă. Specie sporogena de azotomicete formează patru tipuri de spori: oidio-
mi, conii, sporangiospori și chlamidospori.

Levins sau *dropsule*, taxonomic încadrate în filulul *Eumycetes* (fungi *obscuri*) se prezintă în mod obișnuit și dominant în formă unicelulară și au o organizare internă de tip eucariot. Ele se înmulțesc în mod obișnuit

Macrogoniile sunt fungi filamentoși cu structură celulară de tip eucariot și se reproduc prin spori asexuați (zoospori, sporangiospori, conidiospori, clamidospori, oidiospori) și spori sexuați (ascospori, bazidiospori, zigospori).

1213 Dinamica multigenerațiilor populațiilor bacteriene

În condiții experimentale, dinamica multiplicării populațiilor bacteriene este bine cunoscută. Procesul evoluează într-o serie de faze succesive (fig. 3.16).

În faza de latență sau lag este cuprinsă întreaga perioadă de timp de la introducerea germeniilor în mediul de cultură (inocularea) și momentul în care celulele acestora încep să se multiplice. În cursul acestei faze, numărul bacteriilor din inoculum rămâne neschimbat sau chiar scade temporar. Cultura nu este vizibilă macroscopic. Această fază

durată în medie cinci ore (se observă) în modal cel mai evident atunci când bacteriile în studiu provin din culturi vechi, populația tend să scade în principal din forme de rezistență, iar rădăle sunt deficiente în amino-sa în produși intermediari de metabolism.

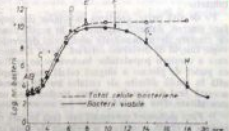


Fig. 1.15. Curba de creștere a unei populații bacteriene în raport cu timpul, exprimată prin logaritmul numărului de bacterii.

bacteriilor este excepțional de mare. Durata unei generații-interval de timp dintre două diviziuni succesive 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 populațiilor bacteriene este bine cunoscut. Acesta cuprinde mai multe faze (fig. 4.1), care sunt descrise în continuare.

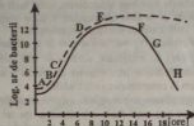


Fig.4.1. Curba de creștere a unei populații bacteriene (Gh. Zarnea):
 A - însușire; A-B - faza de lag; B-C - faza de accelerare a ritmului de creștere;
 C-D - faza de multiplicare logaritmică; D-E - faze de încetinire a ritmului de creștere;
 E-F - faza staționară; F-G - faza intermediară de declin; G-H - faza de declin;
 --- număr total de celule din mediul de cultură.

Faza de latență sau lag. Este cuprinsă între momentul introducerii germenului în mediul de cultură (inoculare) și momentul în care celulele acestuia încep să se multiplifice. În această fază, numărul bacteriilor din inocul rămâne nesemnificativ sau chiar scade temporar. Cultura nu este vizibilă macroscopic. Această fază durează în medie câteva ore. Faza de latență apare ca o perioadă de adaptare la noile condiții de cultivare. În această perioadă bacteriile viabile din inocul își actualizează la celulă metabolismul esențial și sistemele enzimatice necesare creșterii.

La transvazarea inoculului într-un mediu nutritiv, se înfățișează, în principal,

două stadii:

- dacă inoculul bacterian provine dintr-o cultură aflată în curs de multiplicare și se transvazează într-un mediu nutritiv cu aceeași compoziție, multiplicarea bacteriilor își menține în continuare ritmul rapid (este cazul transvazei inoculului în intermediar, operație efectuată numai pentru obținerea de cantități mai mari de inocul necesare fazei următoare de biosinteză numită: fază de

- dacă bacteriile provin dintr-o cultură tot în fază exponențială de multiplicare dar se transfazează un mediu nutritiv cu altă compoziție, atunci ele au o perioadă de adaptare, creșterea lor nefiind evidențiată de la început.

curs de multiplicare în aceleași condiții de mediu ca și cele oferite noii culturi inițiate, multiplicarea bacteriilor și menține în continuare ritmul rapid, în sfârșit, dacă bacteriile provin dintr-o cultură tot în fază exponențială, din care creșterea pe un alt mediu decît în cel care au fost transferate, după o perioadă de latență, necesară inducției unor enzime corespunzătoare noii substrat nutritiv. 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 care bacteriile viabile din inoculum necesare creșterii, în cazul în care aceste componente biochimice le lipseau datorită condițiilor de viață anterioare înasimțării.

2) *Faza de multiplicare exponențială sau de creștere logaritmică* este caracterizată prin aceea că, după o scurtă perioadă (circa 2 ore) de accelerare a ritmului de creștere, în care multiplicarea se produce cu o viteză progresivă mărîtă, acest ritm devine constant și caracteristic pentru un organism dat în anumite condiții de cultură, durata unei generații fiind minimă. În această fază celulele considerate a fi de tip embrionar, au dimensiuni mai mici decît cele caracteristice speciei, iar citoplasma lor este omogenă, nu conține materiale de rezervă și are o mare afinitate pentru coloranții bazici datorită conținutului ei ridicat în ARN. Celulele aflate în faza exponențială de multiplicare sînt cele mai potrivite pentru cercetări de genetică și fiziologie bacteriană.

Diviziunile sînt destul de bine sincronizate și numărul celulelor viabile se dublează brusc și la intervale regulate: populația bacteriană crește temporar după o progresie geometrică cu rația $2: 2^1, 2^2, 2^3, 2^4, \dots, 2^n$. Deși foarte caracteristică pentru bacterii, capacitatea de creștere exponențială se manifestă cu atare numai o scurtă perioadă de timp atît în natură, cît și în condiții artificiale. După un timp relativ scurt, tendința de multiplicare rapidă scade progresiv, datorită epuizării substanțelor nutritive din mediu și acumulării în el a produselor de catabolism în concentrații cu efect inhibitor.

Pe de altă parte, creșterea indivizilor din populația bacteriană nu se mai face sincron, datorită faptului că în aceste condiții de încrețire a ritmului de creștere devin manifeste unele mici diferențe individuale în ceea ce privește timpul de diviziune celulară. Acest fenomen de încetinire și desincronizare a creșterii populațiilor bacteriene se produce chiar dacă o cultură are ca punct de plecare o singură celulă, înclî după cîteva generații, celulele se află în stadii diferite ale ciclului lor de dezvoltare. Unii autori denumesc această fază de *post-log*, cultura tindînd spre un echilibru între diviziuni și mortalitate. Din această fază se pot amorsa biosintezele în culturi continue.

3) *Faza staționară maximă* este faza în care numărul celulelor viabile este maxim și rămîne constant o perioadă de timp care durează de la cîteva zile, în funcție de sensibilitatea bacteriilor la condițiile favorabile de mediu. În cursul în care intrarea culturilor în faza staționară este determinată de epuizarea substanțelor nutritive din mediu, celulele nu se mai înmulțesc, iar numărul total al indivizilor populației este constant și egal cu numărul celulelor viabile.

Durata perioadei de latență variază, deci, în funcție de noile condiții de mediu pe care microorganismele le găsesc la transvazare. Cu cît aceste condiții noi (mediu nutritiv, temperatură, pH, aerare) sînt mai apropiate de cele anterioare, cu cît perioada de lag este mai scurtă.

Faza de multiplicare exponențială sau de creștere logaritmică. Această fază începe în momentul de la care începe creșterea (cca 2h) de accelerare a ritmului de creștere, în care multiplicarea se produce cu o viteză progresivă mărîtă. După această perioadă, diviziunile sînt bine sincronizate, astfel încît numărul celulelor viabile se dublează brusc și la intervale regulate după o progresie geometrică $2, 2^1, 2^2, 2^3, \dots, 2^n$, adică are loc o creștere exponențială.

Capacitatea de creștere exponențială se manifestă cu 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 produselor de catabolism în concentrații cu efect inhibitor.

În faza de multiplicare exponențială, celulele considerate a fi de tip embrionar au dimensiuni mai mici decît cele specifice speciei de care aparțin, citoplasma lor este omogenă, nu conține materiale de rezervă și are o mare afinitate pentru coloranții bazici, datorită conținutului ridicat în ARN. Întrucît această perioadă corespunde unor transformări permanente, celulele aflate în faza exponențială de multiplicare sînt cele mai potrivite pentru lucrări de genetică elementară în scopul obținerii de noi tipuri producătoare.

Spre sfârșitul fazei de multiplicare logaritmică apare o așa-numită perioadă de post-log, în care are loc un fenomen de încetinire și de sincronizare a creșterii populației bacteriene, celulele aflîndu-se în stadii diferite ale ciclului lor de dezvoltare. În această perioadă cultura tinde spre un echilibru între diviziuni și mortalitate. Din această fază sînt amorse biosintezele în culturi continue.

Faza staționară maximă. Este faza în care numărul celulelor viabile este maxim și rămîne constant o perioadă de timp care durează de la cîteva zile, în funcție de sensibilitatea bacteriilor la condițiile de mediu.

Într-o cultură în faza staționară este determinată, de obicei, de epuizarea fază, celulele nu se mai multiplică, iar numărul total al indivizilor populației este constant și egal cu numărul celulelor viabile. În această fază celulele bacteriene sînt mai mici decît în faza de creștere exponențială, citoplasma mai puțin omogenă datorită apariției de incluzii și acumulării, citoplasma mai puțin afinitate normală pentru coloranți și prezenta sporilor la specii sporogene.

Faza de declin. Este faza corespunzătoare unei scăderi progresive a numărului celulelor viabile datorită morții unui număr foarte mare de celule. Celulele din această fază sînt foarte mici, apărînd fenomene de involuție: celulele mici, sfărșite, deformate, gigante sau ramificate, care se colorează slab sau capătă

Atunci când este vorba de o lipsă parțială de substanțe nutritive sau de acumularea unor produși toxici, multiplicarea persistă în ritm încetinit, dar este contrabalansată de o mortalitate cu ritm echivalent: numărul celulelor rămân constant, în timp ce numărul total al bacteriilor din cultură scade și se ajunge la moartea culturii. În această fază celulele bacteriene sînt cîștigate mărime, avînd morfologia descrisă drept caracteristică pentru fiecare specie: dimensiuni mai mici decît în faza de creștere exponențială, citoplasma mai puțin condensată datorită apariției de incluzii și acumulării unor substanțe de rezervă, afinitate moderată, normală, pentru coloranți și prezența sporilor în speciile sporogene.

4. *Faza de deces* corespunde unei scăderi progresive a numărului celulelor viabile, mergînd pînă la sterilizarea bacteriologică a culturii. La un moment dat, numărul bacteriilor viabile scade în progresie geometrică în raport cu timpul, datorită morții unui număr foarte mare de celule. Uneori celulele viabile pot persista cîteva luni, multiplicîndu-se lent pe seama substanțelor nutritive liberate prin liza celulelor moarte. Celulele din această fază, celulele moribunde, au un polimorfism marcat, determinat de prezența formelor de involuție (celule mici, scleroizate, deformate, gigante sau ramificate) se observă foarte slab, uneori doar ca umbră, sau capătă chiar afinitate pentru coloranți acizi, iar la speciile sporogene apar în cultură foarte mulți spori. În unele cazuri se produc fenomene de autoliză, ceea ce determină scăderea numărului total de celule din mediu.

Conținutul unei populații bacteriene se poate aprecia direct prin mai multe metode, iar determinarea substanței uscate a masei celulare, datorită într-o cultură a unuia dintre constituenții bacterieni elementari — C sau N —, aprecierea cantitativă a unei enzime sau a unui produs metabolic și evaluarea tendinței totale al celulelor bacteriene (vii și moarte), cu ajutorul celei microscopice de numărare, sau a numărului celulelor viabile (capabile de multiplicare) prin înămînare pe medii de cultură solidificate. Ca metode indirecte se folosesc aprecierea gradului de turbiditate al suspensiilor bacteriene într-un mediu lichid, în raport cu o scară etalon sau la fotocolimetru, determinarea absorbției razei $U \cdot V$, cu lungimi de undă de 2800 Å specifică pentru proteine sau 2300 Å specifică pentru acizii nucleici etc.

Spe deosebire de bacteriile propriu-zise, actinomicetele cresc sub formă de colonii în medii lichide, deoarece la aceste microorganisme singurele celule individuale sînt conidiile.

233.2. Dinamica procesului creșterii la fungi

Cinetica de creștere a levurilor este similară cu cea a bacteriilor. Creșterea micoparazitilor. Este limitată în mod caracteristic la extremitatea liberă a hifelor. Ea poate continua prin extinderea hifelor periferice, atîta timp cît mediul conține substanțe nutritive. Procesul a fost urmărit mai în amănunt la miceliile septate, deși același principiu se aplică și celor eozinotice. După alungirea celulei terminale și însoțirea de perete celular, urmează procesul de formare a septului transversal, avînd ca rezultat delimitarea a două celule fiice. Cea apicală continuă ciclul de creștere și diviziune, pe cînd celula subterminală participă doar facultativ la creștere și anume nu

mai atunci când produce o ramificație laterală, dotată, la rândul ei, cu cam-pusculă de creștere apicală și de diviziune. În unele cazuri (la unele *Bacillus*) un singur miceliu poate atinge până la 15 metri. Pe măsură ce miceliul crește la periferie, conținutul citoplasmic poate să dispară în partea distală, și cel mai vechi al coloniei. Creșterea unui miceliu pornind de la un miceliu creștea la periferie. Creșterea unei micelii parcurge mai multe faze: centrală, cu mai vechi al coloniei. Creșterea unei micelii parcurge mai multe faze: centrală, cu mai vechi al coloniei. Creșterea unei micelii parcurge mai multe faze: centrală, cu mai vechi al coloniei. Creșterea unei micelii parcurge mai multe faze: centrală, cu mai vechi al coloniei.

Faza de creștere liniară, corespunzătoare creșterii liniare în raport cu timpul. Viteza de apăsare a coloanei circulară care crește în linie în raport cu timpul, în timp ce în zona de creștere se menține constantă la marginea coloanei, în timp ce în zona de creștere în centrul creșterii este mai lentă sau chiar încrețită. Creșterea coloanei în suprafață nu este corelată cu creșterea ei în greutate. În medii sărace în substanțe nutritive, colonia se extinde mai repede, însă sub forma unei rețele fine de hîle, în timp ce pe medii bogate, creșterea ei în diametru este mai lentă dar micul format este mai gros.

Faza de încheiere se traduce prin înălțarea vitezei de creștere pe măsură ce colonia se apropie mai mult sau mai puțin de bariera mecanică reprezentată de marginea incintei în care s-a dezvoltat, dar ca este de fapt determinată de efectul de inhibiție exercitat de metabolism liberat din colonie. La unele specii se însoțește de liza miceliului în centrul coloniei. Incetinirea ritmului de creștere apare mai repede când cultura se dezvoltă în medii bogate în substanțe nutritive și la temperaturi optime și supraoptimale, acumularea produsilor de metabolism făcându-se mai rapid în aceste condiții.

De aceea, în condițiile noastre, facem necesară mai rapidă în acțione condiții.

În Crăciun, cultura colonizată în mușcetăci pe medii solide, lichide în culturi de suprafață sau submersive evoluează cu o viteză variabilă în funcție de tulpină, mediu de cultură și factorii de mediu (temperatură, pH, aerare, agitare, presiune osmotică etc.). La funcții acceptate, alungirea micelului poate ajunge la 3 mm pe oră la 25°C. În medii lichide, în culturi statice, funcții produc o „pinză” miceliana la suprafața lichidului astfel că diferitele părți ale culturii se găsesc în condiții diferite de mediu, în special sub raportul gradului de aerobiozitate.

De aceea, în necesitatea, înțelegem că

De aceea, în procesele biotehnologice industriale în care este necesară o dezvoltare abundentă și egală a mucegaiului, se asigură condiții fiziologice în aceste condiții se realizează o dispersare a micelului însoțită de apariția unor microcolonii sferice.

3.4. Medii de cultură

Un mediu de cultură poate fi definit ca un suport nutritiv sterilizat, care permite dezvoltarea și studiul unui microorganism în afara ariei sale naturale. În procesele biotehnologice mediul de cultură are o mare importanță asupra reproductibilității și eficienței tehnologiilor respective. Pe baza diferitelor criterii privind compoziția, consistența, natura ingredientelor și după clasificarea: mediul lichid, mediul solid, mediul semisolid.

96 Datele furnizate de tehnologia pilot elaborată constituie elemente de proiectare pentru instalațiile industriale.



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

5.3. MEDII DE CULTURĂ

În procesele biotehnologice, mediile de cultură sunt constituite din suporturi nutritive sterilizate care permit dezvoltarea și studiul unui microorganism, în afara surselor ecologice naturale. Compoziția mediilor de cultură are o mare importanță asupra reproductibilității și eficienței tehnologiilor respective.

In funcție
se clasifică astfel:

- după consistență: medii lichide, solide, semisolide;
- după compoziție:
 - medii naturale, care conțin elemente nutritive, de origine vegetală sau animală;
 - medii sintetice, care conțin numai compuși cu structură chimică cunoscută, care pot fi dozați;
- după tipul respirator al microorganismelor cultivate: medii pentru organisme aerobe sau anaerobe;
- după scopul și frecvența întrebuințării:
 - medii de uz curent;

... după tipul respirator al microorganismelor cultivate: medii pentru micro-organismele aerobe sau anaerobe.

... după compoziție: medii naturale, care conțin elemente nutritive provenite din țesuturi vegetale, animale și medii sintetice, care conțin numai compoziția cu structura chimică cunoscută, dozabilă;

... după scopul și frecvența îmbolnăvirii: medii de uz curent și medii speciale de izolare care pot fi la rândul lor electice, selective, de îmbogățire, de conservare și de identificare.

În practica biotehnologică se utilizează în mod curent medii naturale datorită pe bază de subproduse agroalimentare (proturi de floarea soarelui, de soia, făina de porumb, tărâțele de grâu, extractul de porumb etc.). Acestea au inconvenientul unei standardizări dificile din cauza variabilității compoziției și al posibilității de a conține substanțe mediorice. Se cercetează posibilitatea extinderii mediilor sintetice, perfect reproducibile la scară industrială.

Indicent de medii utilizat, pentru dezvoltarea microorganismelor tre- buie asigurate sursele de carbon, azot, fosfor, oligoelemente, factori de creștere.

Pentru creșterea randamentelor în faza de biosinteză se adaugă la mediu, substanțe care sînt substanțe avînd porțiuni structurale ale moleculei pro- duse de biosinteză. În toate procesele biotehnologice sursa principală de energie o constituie carbohidrații. În procesele catabolice prin oxidarea bio- chimică a glucozei se eliberează o mare cantitate de energie, din care o parte este immagazinată în compuși macroergici, iar restul este preluat de mediul de cultură dinaintea cu ajutorul sistemelor de termostatare ale bioreactorilor. Pepples și Harrison (1970, 1971) au demonstrat importanța compo- ziției elementare a microorganismului pentru stabilirea formulei corecte a mediuului de dezvoltare. Autorii citați au stabilit necesarul de componente nutritive funcție de compoziția elementară a levurii *Candida utilis*. Azotul se adaugă ca amoniac, necesarul minim fiind de $\left(8,2 \frac{17}{14}\right) \cdot 10^3$ părți amoniac

la 100 de părți biomasă uscată produsă. Potasiul este furnizat ca KCl $\left(12 \frac{74,5}{39}\right)$ 4,2 părți KCl la 100 părți de drojdie. Necesarul de fosfor $\left(1,30 \frac{31}{31}\right)$ 4,9 părți de H_3PO_4 sau $\left(1,55 \frac{149}{31}\right)$ 7,5 părți de $(NH_4)_2 PO_4$, caz în care necesarul de amoniac scade la $\left(7,5 \frac{17}{1,9}\right)$ 8,5 părți iar necesarul de sulf se furnizează în proporție de $\left(0,4 \frac{174}{32}\right)$ 2,17 părți K_2SO_4 la 100 părți drojdie uscată.

Celule de mai sus reprezintă valori minime pentru dezvoltarea nerestric- tă, ciad nici unul din aceste elemente nu apare în materia primă.

Sursa de carbon va furniza hidrogenul și cea mai mare parte a oxigenului. Sursa de oxigen depinde desigur de aerarea mediului. Datorită eficienței scăzute a transferului de oxigen de la interfața bulelor de aer la mediul și apoi la microorganism este necesară de cantități de oxigen mult sporite. Greu- tătea echivalentă de oxigen consumată de către celule ar necesita să se con-

$$\frac{B}{S_0} = \frac{(1 + \psi)(W + k_2)}{c_0 - W - k_2} \cdot \frac{A}{S_0} \quad (3.75)$$

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

$$W_{cr} = \frac{k_1 S_0 + k_2 + k_3 + k_4 + k_5}{2} \times \left[\left(1 + \frac{4k_1 S_0 (k_2 - k_3) - k_4 (k_2 + k_3 + k_5)}{(k_1 S_0 + k_2 + k_3 + k_4 + k_5)^2} \right)^{1/2} - 1 \right] \quad (3.76)$$

Pe măsura sporirii concentrației S_0 , valoarea W_{cr} se apropie de limita $c_0 - k_4$; pentru ca reactorul de biosinteză să fie productiv, S_0 trebuie să depășească valoarea $\frac{k_4(k_2 + k_3 + k_5)}{4k_1(c_0 - k_4)}$; la $W = 0$ și $W = W_{cr}$, concentrațiile

A și B devin nule.

Rendamentul utilizării substratului este:

$$Y = \frac{A + B}{S_0 - S} = \frac{W \left[1 + \frac{(1 - \psi)(W + k_2)}{c_0 - W - k_2} \right]}{\frac{W + k_2}{c_0 - W - k_2} [W - (1 - p_1)k_1 - p_1 k_3 + (1 - p_2)k_4 + p_2 c_0 k_5] - p_1 k_4} \quad (3.77)$$

3.5.4. 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 biosinteză, în special tive sporose, de obicei și parametrii fiziologici speciilor nutriționale microbiene, dar numai până la o valoare limită, peste care sporirea concentrației speciilor nutritive rămâne fără efect, sau la sporuri de substrat.

Acțiunea unui inhibitor asupra celulei microbiene se poate exercita prin:
a) modificarea potențialului chimic al substratului, al unui intermediar sau al produsului de reacție; b) modificarea permeabilității peretelui celular și reducerea transportului speciilor nutritive; c) modificarea reactivității enzimei influențarea procesului de biosinteză al echipamentului enzimatic prin

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 biosinteză;
- agitația;
- concentrația oxigenului dizolvat.

4.2.1. Influența concentrației substratului asupra procesului de biosinteză

Celula microbiană, datorită volumului ei redus, este extrem de sensibilă la variațiile locale ale parametrilor procesului de biosinteză, în special la variațiile concentrației de substrat. Măritarea concentrației de substrat în mediul de cultură poate conduce la sporirea numărului de celule microbiene, dar numai până la anumite limite, multiplicarea acestora fiind încetinită de procese de inhibiție care au loc la nivelul celulei.

Acțiunea unui inhibitor asupra celulei microbiene se poate exercita prin:

- modificarea potențialului chimic al substratului, intermediarilor metabolici sau a produsului final;
- modificarea permeabilității peretelui celular și reducerea transportului speciilor nutritive;

Modificarea activității enzimelor implicate în procesul metabolic;
- disocierea agregatelor metabolice;
- modificarea parametrilor funcționali ai celulei microbiene (capacitatea de multiplicare, mobilitatea, biosinteza unor metaboliți).

- Mecanismele prin care se realizează inhibiția sunt:
- reacție chimică cu una sau mai multe componente celulare;
 - adsorbția sau complexarea unor enzime sau coenzime;
 - intervenția în procesul de reacții biochimice;
 - intervenția în disocierea complexelor enzimatic;

interacțiuni cu genomul sau cu procesul de transcripție; f) influențarea parametrilor funcționali ai celulei microbiene (viteza de mutație, capacitatea de reproducere, mobilitatea, biosinteza unor metaboliți etc.).

Mecanismele prin care se poate exercita această inhibiție sînt: a) reacție directă cu una sau mai multe componente celulare; b) adsorbția sau complexarea de enzime, coenzime sau componente nutritive; c) intervenția în procesul reacțiilor biochimice; d) intervenția în disocierea complexelor enzimatiche; e) modificarea parametrilor fizico-chimici ai mediului de biosinteză (pH, ionicitate, constantă dielectrică, capacitate de solvatare etc.); j) intervenția în funcțiile celulare de control.

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

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

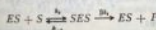
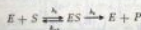
în care: V este viteza de reacție;

S — concentrația de substrat.

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

$$V = \frac{V_m}{1 + \frac{K_2}{S} + \sum_{j=1}^n \left(\frac{S}{K_j} \right)} \quad (3.79)$$

Dacă enzima are mai mulți centri activi și prezența sau absența substratului la unul din centri influențează activitatea celorlalți:



procesul este descris de ecuația:

$$V = \frac{V_m \cdot S \left(1 + \frac{\beta \cdot S}{K_n} \right)}{S + K_m + \frac{S^2}{K_n}} \quad (3.80)$$

în care:

$$V = dP/dt; \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}; \quad K_n = \frac{k_3 + \beta k_2}{k_3}$$

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

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

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

$$C_g = K_L \cdot a (C_a - C_L) \quad (4.54)$$

în care: C_g — este concentrația oxigenului dizolvat;

K_L — coeficient global de transfer;

a — suprafața interfațială gaz-lichid;

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

C_L — concentrația oxigenului în apă.

Pentru sistemele intens aerate, valorile produsului $K_L \cdot a$ sint cuprinse între 70 — 400 mMo₂ absorbit/1 oră.

O formă generală a ecuației de transfer de masă este:

$$\frac{dW_g}{a \cdot dt} = \frac{P_g - P_L}{\frac{1}{H} + \frac{1}{k_L}} = K_{og}(P_g - P_L) = \frac{C_a - C_L}{\frac{1}{Hk_g} + \frac{1}{k_L}} = K_{ol}(C_a - C_L) \quad (4.55)$$

unde: P_g, P_L — sint presiunile parțiale ale oxigenului în faza gazoasă, respectiv în echilibru cu concentrația globală din faza lichidă;

k_g — coeficientul de transfer de masă al filmului gazos;

k_L — coeficientul de transfer de masă al filmului lichid;

K_{og}, K_{ol} — coeficienți corespunzători globali de transfer de masă;

C_a, C_L — concentrațiile oxigenului dizolvat în echilibru cu presiunile parțiale P_g în faza gazoasă și P_L în faza lichidă;

H — constanta lui Henry ($P_g = H \cdot C_L$; $P_L = H \cdot C_L$);

W_g — cantitatea de oxigen absorbită.

precizie se adaugă diverse substanțe chimice (acizi sau baze) așezate în funcție de mai mulți factori, în cazul în care valoarea pH-ului este sub cea prescrisă, se pot folosi, pentru corectare, soluții de NaOH sau KOH în funcție de compoziția chimică a mediului și de necesarul în ioni de Na⁺ și K⁺ al microorganismului. În situația în care valoarea pH-ului este peste cea prescrisă, se poate adăuga acid clorhidric, acid sulfuric sau acid azotic, în funcție de caracteristicile microorganismului (ionul Cl⁻ sau un inhibitor), de compoziția chimică a mediului (adăugarea de acid să nu inhibeze creșterea), de compoziția chimică a mediului (adăugarea de acid sulfuric se poate conduce la formarea unor săruri greu solubile), precum și de materialul de construcție al vaselor de reacție și al bioreactorilor (probleme de coroziune).

— prin efectul de disociere a acizilor și bazelor, pH-ul acționează asupra caracteristicilor suprafeței celulei, modificând proprietățile ei de aderare la diferite materiale (sticlă, metale) 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 circulație exces față de nevoi. De aceea, se urmărește în general obținerea unei aerării cât mai eficiente, transferul de oxigen din faza gazoasă în faza lichidă (mediul de fermentație) având loc cu viteze mari.

În cazul în care procesul de biosinteză se desfășoară în laborator la scară mică, aerarea depinde de următorii parametri:

- viteza de rotație sau rotație a agitatorului;
- mărimea fluoanelor Erlenmeyer;
- volumul de mediu de cultură din flacon;
- creșterea turbulenței prin picare.

Eficiența aerării unui mediu de cultură este reflectată de concentrația de oxigen dizolvat. Există mai multe metode de determinare a eficienței aerării:

- metoda saftă, care permite măsurarea vitezei maxime de transfer a oxigenului din aer în mediu;
- metoda polarografică de determinare a concentrației oxigenului dizolvat în mediu.

— utilizarea electrobilă cu membră pentru măsurarea concentrației de O₂ dizolvat și a consumului de O₂;

— utilizarea analizoarelor paramagnetice de O₂, care analizează compoziția aerului în suprafața bioreactorului și a compoziției celui care intră.

Pentru evaluarea cineticii transferului de O₂ se utilizează de cele mai multe ori metoda bazată pe oxidarea practic instantanee a sulfidului de sodiu

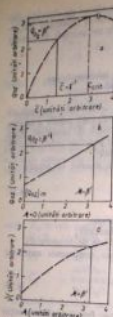


Fig. 4.13. Dependința ratei vitezei specifice de dezvoltare, vitezei de creștere, vitezei de înmulțire a produsului și concentrației substratului dizolvat.

momentul atingerii concentrațiilor ridicate de celule de microorganisme. Necesarul de oxigen al culturii reprezintă produsul celor doi parametri: utilizat. Datorită vitezei mai mari de utilizare a mediului de biosinteză dublarea de către *Penicillium* de exemplu, necesarul de monozaharidelor față de la utilizarea glucozei ca sursă de carbon, față de zaharoză. Necesarul de oxigen este de asemenea limitat de viteza de furnizare a substratului rețos de către enzimele din ciclul respirator și de cantitatea și caracterul acestor enzime. Componentele anorganice ale mediului de biosinteză însăși sunt transformări intracelulare (prin mărirea rezervelor de oxigen se dublează).

În anumite condiții însă, în special la dezvoltarea fungilor se formează agregate de microorganisme care modifică sensul comportarea sistemului.

Concentrația corespunzătoare valorii maxime a μ_0 are valori cuprinse între 0,1 ... 1,0 p.p.m. Valoarea μ_0 depinde direct proporțional de rata de creștere specifică, intersecta cu nul de rata specifică de creștere. Corelația vitezei de rate specifică de creștere. Corelația vitezei de rate specifică de creștere. Corelația vitezei de rate specifică de creștere.

Produsul dintre rata consumului de oxigen μ_0 și concentrația celulelor de microorganisme din mediul de biosinteză reprezintă necesarul de oxigen pentru unitatea de volum de cultură:

$$\text{Necesarul de } O_2 (\text{mM}_2/\text{l oră}) = C_c \cdot \mu_0 / 22,4 \quad (4.63)$$

unde: C_c este concentrația în grame celule s.u.l.; μ_0 se exprimă în l/oră; iar 22,4 — factorul de transformare în mM.

Această valoare a necesarului de oxigen reprezintă, maximul, valabil pentru $C_c > C_{lim}$.

Este esențial, 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 consumului de oxigen sporește rapid până la o valoare maximă încă din primele stadii ale procesului de biosinteză, scăzând apoi. Valoarea maximă a μ_0 nu coincide de obicei cu momentul atingerii ridicate de celule de microorganisme.

Necesarul de oxigen al culturii reprezintă produsul celor doi parametri: utilizat. Datorită vitezei mai mari de utilizare a mediului de biosinteză dublarea de către *Penicillium* de exemplu, necesarul de monozaharidelor față de la utilizarea glucozei ca sursă de carbon, față de zaharoză. Necesarul de oxigen este de asemenea limitat de viteza de furnizare a substratului rețos de către enzimele din ciclul respirator și de cantitatea și caracterul acestor enzime. Componentele anorganice ale mediului de biosinteză însăși sunt transformări intracelulare (prin mărirea rezervelor de oxigen se dublează).

În anumite condiții însă, în special la dezvoltarea fungilor se formează agregate de microorganisme care modifică sensul comportarea sistemului.

calității de metale grele în prezența oxigenului dizolvat; în acest mod s-a stabilit

$$v = K_L \cdot \alpha \cdot (C_s - C_L)$$

în care: v este viteza de transfer a oxigenului prin filmul de lichid de la suprafața lui; K_L — coeficient global de transfer; α — suprafața interfațială gaz — lichid; C_s — concentrația oxigenului la suprafață, egală cu valoarea de saturație pentru sistemul aer — apă, la temperatura dată; C_L — concentrația oxigenului în apă.

Pentru sistemele interes aerare, valorile produsului " $K_L \cdot \alpha$ " sunt cuprinse între 70 și 400 mM O_2 absorbit/l oră.

În cazul reactorilor de biosinteză, aerarea se aplică unui sistem deosebit de complex, conținând numeroase substanțe dizolvate și având o concentrație ridicată de microorganisme suspendate. Alegerea parametrilor sistemului de aerare este determinată de necesitatea furnizării unei cantități de oxigen suficientă pentru a asigura o valoare maximă a activității metabolice în reactoarele de biosinteză; în acest caz, un anumit microorganism și un anumit mediu de cultură se caracterizează printr-o rată de utilizare a oxigenului specifică.

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

Rata consumului de oxigen sporește rapid până la o valoare maximă încă din primele stadii ale procesului de biosinteză, scăzând apoi (fig. 4.3). Valoarea maximă a ratei de consum a oxigenului (μ_0) coincide, de obicei, cu momentul atingerii concentrațiilor ridicate de celule la microorganisme. Necesarul de oxigen al culturii este influențat de mediul de biosinteză utilizat. De exemplu, datorită vitezei mari de utilizare a monozaharidelor față de dizaharide, de către *Penicillium*, necesarul de oxigen este dublu la utilizarea glucozei ca sursă de carbon față de zaharoză.

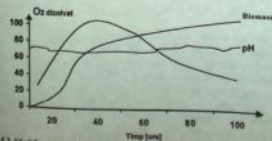


Fig. 4.3. Modificarea concentrației de O_2 , pH-ul și concentrația de biomasă celulară pentru *Mycobacterium terrae*.

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, vâscozitatea fluidului din reactorul de biosinteză sporește mult (se ating valori de 10 000 cP). În aceste condiții disparea 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, bulele tinzând să circule prin canale preferențiale, cu rezistență redusă la înaintare. Una din soluțiile utilizate curent este montarea unui al doilea agitator la carcasa haltinge deasupra primului, determinând o mișcare uniformizantă a conținutului reactorului de biosinteză cu prețul tot al măritii substanțiale a consumului energetic.

Barbotarea aerului prin materiale poroase. Permite obținerea de suprafețe interfaciale mari, prin micșorarea diametrului bulelor furnizate. Dezavantajul 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 barbotarelor din materiale sintetizate o constituie sistemul format dintr-o spirală de sârmă înfășurată 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 reactorul de biosinteză de volum mare, în care haltingea coloanei de lichid determină mărirea timpului de contact între fază, iar regimul turbulent sporește transferul de masă, micșorând importanța diametrului orificiilor barbotorului.

În condițiile fluxului turbulent, dimensiunile bulelor de gaz sînt influențate de valoarea numărului lui *Reynolds* în modul descris de ecuația:

$$\frac{\sum nD^3}{\sum n d^3} = \frac{D_s \cdot V \cdot \rho C}{\eta_c} \quad (4.54)$$

în care: V este viteza fluxului de aer.

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

$$k_L \left(\frac{D_s}{D} \right) = \left(\frac{n D_s^2 \rho}{\eta} \right)^{1/3} \left(\frac{\eta \cdot g}{D} \right)^{1/3} \quad (4.55)$$

în care: D_s este diametrul circumferinței descrise de agitator;

n și g sînt constante experimentale.

92
 Alți factori care influențează transferul de O_2 sunt:

— prezența în mediul de cultură a agenților tensioactivi, care determină o micșorare a coeficienților de transfer;

— concentrația de microorganisme: la concentrații ridicate de microorganisme, vâscozitatea mediului crește, iar eficiența sistemului de aerare scade, bulele tinzând să 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 corespunzătoare a bulelor de aer și, deci, la mărirea coeficientului de transfer al oxigenului;

— echipamentul de aerare utilizat, care permite obținerea unei dispersii uniforme a bulelor de aer: conductele perforate constituie echipamentul preferat pentru reactorul de biosinteză, de volum mare;

— suprapresiunea, care favorizează mărirea concentrației de oxigen în mediul de cultură, în general procesele biotehnologice fiind conduse la supra-presiuni cuprinse între 0,5 și 1 bar (în scopul micșorării riscului de infecție).

5 ... 6°C

de a-
stament
ridicat,
urbeaz,
st.
timp de
1 minut.
e (lazo-
0 Kicchi

eterioilor
sare loc
al micro-
tial mai
cumul-
chimil-
in

re statio-
ni popa-
K a u a-
creștere
De aceea
fie redus
sarentale.

includnd
tere este
or este de
cel puțin
seva zile.

reperții
le realizat
umeroase
imilari cu
un inocul
dardizate.

e: (fructurile
e de mout
amilas).

it.

se în cazul
inhalacrol.
aportulare,
pe medide
e o spor-

leo, intens, precum și vîrsta optimă a sporilor care formează inoculul. Mediile
de sporulare frecvent utilizate sînt formate din făină de grîu sau pline ume-
scate cu apă în raport de 1:1.

În urmărirea treptată de inoculare celulele vegetative pot fi prelevate
dintr-o fază timpurie de creștere de obicei din faza exponențială.

În cazul fungilor care nu prezintă avantajul de a produce abundent spori
asemși, ca inocul se vor utiliza miceliile vegetative. Problema standardi-
zării, ca inoculul să devină astfel mai dificil deosebe de dezvoltare al
altui inoculului devine astfel mai dificil deosebe de dezvoltare al
altui inoculului reprezintă un alt factor ce va influența cultura din treapta următoare.

În cazul experimentelor cu *Trichoderma* s-a relevat faptul că vîrsta inocu-
lului vegetativ joacă un rol considerabil în obținerea unor curbe de creștere cu
un grad de variație mic.

În condițiile dezvoltării în suprafața a culturii de inocul se impune omo-
genizarea accesiei înainte de efectuarea operației de inoculare. În această
treaptă trebuie avut în vedere și efectul heterocariozei asupra randamentului
diferilor producători utilizați în procesele biotehnologice.

Alge microscopice. Problema obținerii unui inocul standardizat în cazul
alor microscopice este complicată de existența heterogenității condițiilor
fiziologice în care cresc celulele individuale pe suprafața unui mediu soli-
dificat cu agar.

Inoculul poate fi obținut cu bune rezultate din culturi dezvoltate pe medii
lichide, omogenizate, în faza de creștere exponențială.

Pentru obținerea inoculului de alge aparținînd diverselor specii de *Chlorella*,
Synechococcus, *Anabaena*, *Euglena*, s-au dovedit a fi adecvate culturile continue,
deoarece s-a demonstrat că algele nu suferă mutații frecvente.

4.3.2. Influența dimensiunii inoculului asupra proceselor biotehnologice

Calitatea și cantitatea inoculului joacă un rol important pentru
obținerea unor metaboliți cu vîrste și randamente dorite de biosinteză. De
cele mai multe ori se utilizează o cantitate mare de inocul pentru a determina
de dezvoltare rapidă a dezvoltării culturii concomitent cu reducerea riscului
de contaminare. În majoritatea cazurilor este necesar ca dimensiunea inocu-
lului să se situeze între 3-10% din volumul total al culturii. În cazul fungilor
filamentoși dimensiunea inoculului are efecte asupra metabolismului produc-
torului mult mai profunde decît la bacterii sau levuri.

Privind la influența dimensiunii inoculului asupra productivității unor
microorganisme, numeroși autori au relevat spre exemplu că deviația stan-
dard în cazul culturilor diverselor fungi pentru obținerea de micelin, tîndu-
să devină foarte mare la inocule mici.

Pentru standardizarea densității inoculului se extrage o parte bine deter-
minată (reprezentînd raporturi prestabilite între volumul inoculului și
volumul mediului) ce va fi inoculată din cultura aflată într-un anumit stadiu
de evoluție optim pentru obținerea unei producții maxime a metaboliților
doriți. Acestei culturi i se determină numărul de germeni pe unitatea de volum
prin metode directe, indirecte sau i se stabilește conținutul în biomasă (rapor-

— modificarea parametrilor fizico-chimici ai mediului de biosinteză (pH,
tîrse ionice, concentrația dihidroxi, capacitatea de solvatare);
— intervenția în funcțiile celulare de control.

Datorită acestor fenomene, concentrații mari de substrat inhibă dezvoltarea
microorganismelor într-un anumit grad ajungînd chiar la inhibiție totală. Din acest
motiv, pentru un sistem de biosinteză se stabilește concentrația optimă a
substratului atît în momentul inițial cît și pe parcurs. De exemplu, pentru foarte
multe bacterii, concentrația de 10-15% în surse de carbon (glucoză, zaharoză) este
inhibitoare, ele dezvoltîndu-se bine la valori ale sursei de carbon sub 10%.

Acesta este motivul pentru care în solajii foarte concentrate de zahăr (de
exemplu dulcitură, siropuri) microorganismele, în general, nu se dezvoltă, acestea
putînd fi conservate pe o lungă perioadă de timp.

4.2.2. Influența dimensiunii inoculului

Calitatea și cantitatea inoculului joacă un rol important pentru obținerea
unor metaboliți cu randamente dorite de biosinteză. 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 inoculul să se situeze între 3 și 10%
din volumul total al culturii.

Pentru facerea tehnologiei în parte se stabilește așa-numitul "raport optim de
inoculare", care definește cantitățile optime de inocul.

Pentru asigurarea unei productivități bune și pentru măsurarea densității
inoculului, se extrag probe din cultura aflată într-un anumit stadiu de evoluție
optim pentru obținerea unei producții maxime a metaboliților doriți și se determină
parametri specifici (numărul de germeni pe unitatea de volum, sau conținutul în
biomasă raportată la unitatea de volum).

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

La bacterii, cînd se utilizează o cantitate mare de inocul, se micșorează
faza de lag. Aceasta se datorează formării și acumulării unor metaboliți inter-
medieri esențiali care pot difuza în celule și în mediul de cultură mai rapid decît în
cazul utilizării unui inocul mic. Uneori, însă, cantități mari de inocul determină
apărute unei fenomen de autoinhibiție, datorat sensibilității celulelor bacteriene
față de unii produși metaboliți intermediari.

Cînd, cantitatea de inocul este înaltă prea mult, faza de lag poate fi
prelungită la inițiu și aceasta se poate soluționa la o dezvoltare normală a culturii
de microorganisme. S-a observat că în cazul bacteriilor, pentru inițierea dezvoltării
unei inocul, este necesară prezența în mediul de cultură a unei concentrații critice

tați ca substanță uscată la unitatea de volum). Pentru fiecare tehnologie în funcție de condițiile de lucru se stabilesc dimensiunile optime ale inoculului, precum și starea fizică și chimică a acestuia. În momentul operației de inoculare, necesară este asigurarea condițiilor de sterilitate și a temperaturii optime de dezvoltare a microorganismelor.

Efectul determinat de mărimea moleculei la bacterii sau fungi este corelat cu transferul metabolic dintr-o concentrație critică a acestor compuși pînă în momentul cînd se atinge o concentrație. Numeroși autori au descris în literatura celorlalte și în mediul de cultură. Numeroși autori au descris în literatura celorlalte și în mediul de cultură. Numeroși autori au descris în literatura celorlalte și în mediul de cultură.

Efectele determinate de mărimea inoculului sînt specifice pentru diferite microorganisme.

Bacterii. Mesajera rapid de lag cind se utilizează un inocul mare se datorează formării de metaboliți intermediari esențiali care trebuie să fie produși de către culturile tinere. Astfel o cultură care provine dintr-un inocul masiv, va semăna și concentrație critică din aceste componente (care pot difuza) în celele (și în mediul fluid de cultură) mai rapid decît o cultură provenind dintr-un inocul mic. Mărima minimă a inoculului care permite dezvoltarea culturii bacteriene depinde de compoziția substratului. Faza de lag poate fi prelungită la infinit dacă inoculul este mic, în condiții constante de temperatură.

Acet efect a fost demonstrat „total sau nimeni” de către H. Altman (1967). Cercetările comparative asupra medicilor utilizate pentru dezvoltarea culturii bacteriene asociate cu inoculul mic, au relevat efecte determinate de tipul unor infime cantități de compoziții similare, de importanță universală. S-a demonstrat importanța formării unor agenți chelați funcție de cantitatea de inocul, sau substanțe similare care adăugate în mediul de cultură au redus ca reductor de fază lag.

Mayer și Traxler (1962) au arătat că anumiți compuși care pot cuprinde chelați de metale acționează asupra microorganismului *Bacillus subtilis*. Aceste cercetări subliniază importanța acestor compuși în fața de la bacterii.

[illegible]

194

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

Cantitatea de inocul la bacterii are influență mare asupra stadiilor ulterioare ale culturii, determinând diferite stări fiziologice ale celulelor în funcție de care variază caracteristicile de biosinteză a metabolitului dorit.

În cazul levirilor, cantitatea de inocul poate influența, de asemenea, durata fazei de lag sau stadiile ulterioare de dezvoltare, similar cu cele descrise în cazul bacteriilor.

În cazul fungilor, importanța standardizării inoculului vegetativ pentru acest grup de microorganisme este hotărâtoare. 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 fazele ulterioare. Astfel că, în cazul fungilor, cantitatea de inocul influențează mărimea și forma miceliului precum și randamentul în metaboliți.

Raportul de inoculare trebuie să fie stabilit astfel încât cantitatea de micelii dezvoltate să nu fie prea mare în detrimentul secreției metabolitului dorit. O dezvoltare abundentă a masei miceliene conduce în același timp la un consum mare de sursă de carbon, cultura fiind astfel inefficientă.

4.2.3. Efectul temperaturii asupra creșterii microorganismelor

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

În funcție de domeniul de temperatură în care microorganismul și viteza maximă de creștere, acestea se clasifică în:

Se observă că fiecare grup de microorganisme are un domeniu de viață în care viteza de creștere este maximă. Microorganismele industriale sunt, în general, mezofile, astfel încât acest domeniu este plasat în intervalul 25-35°C.

4.3.4. Prelucrarea mediilor de biosinteză Prelucrarea primară a mediilor de biosinteză

Prelucrarea primară a mediilor de biosinteză cuprinde operații cunoscute din tehnologia chimică: limpezirea mediilor prin sedimentare în câmp gravitațional sau centrifugal; recuperarea celulelor microbiene; dezagregarea acestora; concentrarea fazei lichide; alături de acestea se utilizează și procedee mai specifice: fracționarea cromatografică; precipitări cu solvenți organici sau săruri anorganice; purificări și concentrări prin ultrafiltrare sau osmoză inversă și așa mai departe.

Diagrama generală din fig. 4.29 demonstrează complexitatea procedurilor amare, ca și volumul ridicat al echipamentului industrial implicat. Schema de flux variată de la un preparat la altul sau chiar după tehnologia concretă de obținere a acelui preparat.

4.3.1. Filtrarea mediilor de biosinteză

Teoria filtrării și principalele echipamente industriale necesare sînt cunoscute din industria chimică și nu vor fi expuse în cele ce urmează; în afară de necesitatea menținerii unui nivel superior de igienă (sterilizare) filtrarea mediilor de biosinteză este doar în mică măsură deosebită de filtrarea mediilor reactivilor chimici, principalele deosebiri fiind: compoziția chimică deosebit de complexă a mediilor de biosinteză industrială și apariția materialului biologic (bacterii, fungi) care complică atât teoria cât și realizarea practică a operației de filtrare; materialul solid separat în urma filtrării mediilor de biosinteză este hidrofili și extrem de compresibil; epuizarea sa în lichid pînă la umidități scăzute este dificilă; la separarea prin filtrare a microorganismelor contaminante (filtrare sterilizantă), procesul este descris de legile operației de sterilizare.

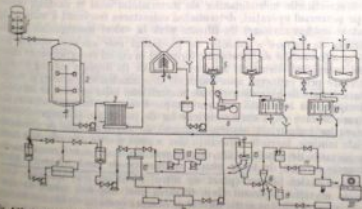


Fig. 4.29. Schema tehnologică a unei stații pilot pentru obținerea preparatelor enzimatice.

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

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

Prelucrarea primară a mediilor de biosinteză cuprinde operații aplicate, în general, în tehnologia chimică cum ar fi: filtrarea, centrifugarea, decantarea, concentrarea fazei lichide, dezagregarea celulelor, extracția, uscarea, atomizarea. Se aplică, de asemenea, în procesele mai specifice cum ar fi: precipitarea cu solvenți sau cu săruri anorganice, purificări și concentrări prin ultrafiltrare.

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

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

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

- **solubilitatea:**
 - în apă sau în soluții diluate de săruri;
 - în solvenți polari (metanol, etanol, acetonă);
 - în solvenți slab-polari (clorform, hidrocarburi);
- **stabilitatea în soluție**, în funcție de pH: efectul temperaturii; efectul soluțiilor tampon; efectul solvenților organici;
- **stabilitatea în stare solidă**, în funcție de temperatură precum și efectul umidității asupra produsului;
- **proprietățile fizice:**
 - dializabilitatea prin membrane;
 - adsorbția pe suprafețe solide;
 - migrarea în câmp electric;
 - sedimentarea în ultracentrifuge;

Ecuația generală Kozeny:

$$u = \frac{A}{K} \cdot \frac{\epsilon^3}{(1-\epsilon)^2} \cdot \frac{\Delta p}{\eta l}$$

în care: u — viteza de parcurgere a stratului de material filtrant;
 A — suprafața de filtrare;
 ϵ — fracția de goluri a materialului filtrant;
 S — suprafața specifică a materialului filtrant;
 Δp — diferența de presiune între cele două fețe ale materialului filtrant;
 η — viscozitatea mediului supus filtrării;
 l — grosimea patului de material filtrant;
 K — constantă, pentru un anumit set de condiții experimentale,

descrie procesul numai într-un mod cu totul 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;
 — fracția de goluri 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, suprafața de contact variind în limite largi în timpul lucrului;

— materialul solid este caracterizat printr-o hidrofobicitate ridicată; apa adsorbită stăpânește mărimea diametrului aparent al porilor sporind fracția de goluri. Măritarea fracției de goluri reprezintă efectul cumulat al adsorbției superficiale a apei, hidratații materialului proteic și formării de masă micelulară hidratată ionic;

— caracteristicile hidrodinamice ale materialului solid se modifică defavorabil pe parcursul operației, determinând colmatarea frecventă a materialului filtrant și scăderea vitezei de filtrare până la valori inacceptabile practic.

Operația de filtrare a mediilor de biosinteză este adeseori ușurată prin utilizarea adjuvanților de filtrare care formează în cursul operației straturi microporoase, micșorând diametrul aparent al porilor (și implicit mărind eficiența).

Una din caracteristicile hidrodinamice ale materialului solid (cu care se amestecă) în principal prin îmbunătățirea porozității. Evaluarea calității adjuvanților de filtrare se face după caracteristicile lor de porozitate și compresibilitate.

Utilizarea lor industrială impune obținerea de porozitate și compresibilitate cât mai mari, întrucât adjuvanții sînt scumpi și trebuie să consumeți

umultorile scheme de lucru (sau o combinație de două scheme):

— pe materialul filtrant (pânză de filtru, hârtie etc.) se aplică un strat

de material filtrant astfel format se execută operația de filtrare. Metoda

de rezultate bune la limpezirea soluțiilor diluate;

— pe materialul filtrant (pânză de filtru, hârtie etc.) se aplică un strat

de material filtrant astfel format se execută operația de filtrare. Metoda

de rezultate bune la limpezirea soluțiilor diluate;

de rezultate bune la limpezirea soluțiilor diluate;

- proprietățile chimice:
- stabilitatea față de diverse enzime;
- stabilitatea la acțiunea unor agenți chimici.

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

- extracția cu solvenți organici;
- separarea pe schimbători de ioni;
- cromatografia;
- adsorbția.

În industria de biosinteză există însă metode de prelucrare integrală a mediului de cultură prin aplicarea diferitelor metode de uscare, produsul rezultat fiind utilizat ca atare. Acest mod de prelucrare a mediilor de biosinteză este mult aplicat în tehnologia aditivilor furajeri (conținând aminoacizi, enzime, vitamine).

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

7.1. FILTRAREA MEDIILOR DE BIOSINTEZĂ

Fată de filtrarea substanțelor chimice, filtrarea mediilor de biosinteză ridică adesea probleme datorită compoziției chimice deosebit de complexe a mediilor și apariției materialului biologic (bacterii, fungi) care complică fenomenul.

Operația de filtrare a mediilor de biosinteză este adeseori ușurată prin utilizarea adjuvanților de filtrare care formează în cursul operației straturi microporoase micșorând diametrul aparent al porilor și implicit mărind eficiența de colectare prin reținerea 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 (pânză de filtru, hârtie) se aplică un strat subțire de material adjuvant (prin filtrarea unei suspensii apoase de adjuvant). Prin patul filtrant astfel format se execută operația de filtrare;

— adjuvantul se amestecă cu suspensia de filtrat, se execută filtrarea regimulund primele porțiuni de filtrat până la limpezirea sa totală;

— răzarea permanentă a stratului de adjuvant, cu ajutorul unor cupete speciale, astfel încât stratul de adjuvant de filtrare este menținut la o valoare optimă;

— viteza de filtrare este menținută constantă. Această variantă este aplicată în cazul filtrelor rotative.

O variantă a operației de filtrare mult utilizată în biotehnologie este filtrarea sterilizantă.

La prelucrarea suspensiilor se face mai întâi o prefiltrare grosieră, urmată apoi de filtrarea sterilizantă propriu-zisă. Pentru filtrarea sterilizantă se montează în fluxul polimeri sintetici) cu diametru redus al porilor, executând apoi în mod normal operația de filtrare.

— adjuvantul se amestecă cu suspensia de filtrat; se execută filtrarea recirculând primele porțiuni de filtrat până la limpezirea sa totală. Metoda prezintă avantajul că pachetul filtrant se colmatează lent — de obicei se utilizează în combinație cu primul procedeu;

— la utilizarea filtrelor rotative, lama de raclare a precipitatului se reglează cât mai aproape de pinza de filtru, grosimea peliculei de adjuvant de filtrare fiind astfel menținută la o valoare optimă predeterminată, iar viteza de filtrare menținută constantă pe întreg parcursul operației.

Pentru filtrarea sterilizantă se montează în filtru plăcie (din acetat de celuloză, arbest 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 întâi o prefiltrare grosieră urmată de filtrarea sterilizantă propriu zisă.

4.3.2. Dezagregarea celulelor de microorganisme

Puterea în libertate a complexului de substanțe conținute în celulele microbiene, în vederea recuperării componentelor interesante, necesită distragerea membranelor celulare semipermeabile și a peretelui și protector. Această operație trebuie efectuată în așa fel încât modificarea proprietăților utile să fie minimă; se preferă procedeele continue la care valoarea timpului de contact între agentul distructiv și componenta labilă este redusă și poate fi exact controlată.

Procedeele de dezagregare ale celulelor microbiene se clasifică după natura agentului de dezagregare utilizat în: procedee mecanice, procedee fizice nemecanice, procedee litice chimice și enzimatic.

Procedee mecanice de dezagregare celulară. Dezagregarea celulelor se poate efectua în mori coloidale sau în mori vibratoare, menținând un anumit raport de recirculare, până când dezagregarea celulelor microbiene este totală. Menținerea sistemului la o temperatură acceptabilă se efectuează prin circulația unui agent de răcire.

Sistemul vibrator Sonomec utilizează un vibrator electromagnetic conectat la un piston; camera pistonului conține o suspensie de celule microbiene și corpuri de măcinare (granule de dioxid de siliciu, sticlă, alumini etc.). Împreună suspende o frecvență de vibrație de 100–200 cicl/secundă, dezagregarea celulelor microbiene este practic totală.

Diferite în principiu sunt sistemele de dezagregare ale celulelor microbiene prin presare (presa Hughes, presa French, presa X). Pasta de celule microbiene — cu sau fără adosați abraziivi — este forțată la presiuni cuprinse între 1.000–6.500 kg/cm² prin orificii sau fante de mici dimensiuni; întregul sistem este răcit cu azot lichid.

Dezagregarea celulelor de microorganisme prin procedee fizice, nemecanice, rapidă, prin înghețare lentă datorită sporirii volumului apei la trecerea în starea solidă sau prin șoc osmotic. Aceasta din urmă metodă are avantajul unei anumite selectivități, determinând trecerea în faza lichidă numai a unora din componentele sistemului.

Un procedeu doborât de eficacie de aplicare a forţelor de forfecare care deter-
mină dezintegrarea celulelor de microorganism este aplicarea de vibraţii
ultrasunore de înaltă frecvenţă (de ordinul a 20 000 Hz) care generează
oscilaţii de presiune foarte mari (de ordinul a 10 MPa) şi amplitudini de oscilaţie
de ordinul a 10 µm. Aceste oscilaţii sunt generate de un transductor piezoelectric
de dimensiuni mici (de ordinul a 1 cm) care este conectat la un sistem de
amplificare şi control. Aceste oscilaţii sunt aplicate la celulele de microorganism
prin intermediul unui sistem de transfer de energie (de exemplu, un sistem de
transfer de energie prin undă acustică). Aceste oscilaţii sunt aplicate la celulele
de microorganism prin intermediul unui sistem de transfer de energie (de exemplu,
un sistem de transfer de energie prin undă acustică). Aceste oscilaţii sunt aplicate
la celulele de microorganism prin intermediul unui sistem de transfer de energie
(de exemplu, un sistem de transfer de energie prin undă acustică). Aceste oscilaţii
sunt aplicate la celulele de microorganism prin intermediul unui sistem de transfer
de energie (de exemplu, un sistem de transfer de energie prin undă acustică). Aceste
oscilaţii sunt aplicate la celulele de microorganism prin intermediul unui sistem de
transfer de energie (de exemplu, un sistem de transfer de energie prin undă acustică).

Enzimele sunt substanțe chimice care catalizează reacțiile chimice. Ele sunt produse de celule și sunt necesare pentru multe procese biologice. Enzimele sunt proteine care ajută la descompunerea alimentelor în molecule mai mici, care pot fi absorbite de organism. Ele sunt, de asemenea, implicate în multe procese fiziologice, cum ar fi respirația celulară și sinteza proteinelor.

Vibrațiile ultrasonice determină, prin dezagregarea celulelor, eliberarea enzimelor caracteristice sistemelor biologice. Primele sint puse în libertate enzimele citoplasmice, iar ulterior, într-o anumită secvență, enzimele mitocondriale. Principala dificultate în calea aplicării industriale a sistemelor ultrasonice de dezintegrare celulară este legată de îndepărtarea din sistem a căldurii.

Dezagregarea celulelor microbiene prin procedee chimice sau enzimatice. Componentele liposolubile ale membraneli celulare sînt distruse prin acțiunea detergenților cationici sau anionici, sau a solvenților organici, determinînd trecerea în fază lichidă a unor din componentele echipamentului enzimatic.

Anumite legături chimice din structura membranelor celulare pot fi scindate prin acțiunea unor preparate enzimatice.

Liza celulelor bacteriene poate fi indusă prin aditia agenților care interferează cu sinteza peretelui celular sau prin atacul enzimatic specific al legăturilor 1-4 dintre moleculele de NAG și NAM.

Apăsia formelor *L.* caracterizate prin absența peretelui celular poate fi lăsată în moduli de cultură prin adăugarea unor concentrații mici de penicilină, care inhibă incorporarea în peretele celulei.

4.1.4.3. *Concentrații* — Incorporarea în peretele celular a substanțelor care alcătuiesc nucleul și proteomul este însoțită de o creștere a concentrației micii de penicilină. Nu s-a observat nici o diferență în raportul dintre concentrațiile de penicilină în mediu și în celulele bacteriene. Lunden și Halle (1963) au obținut forme *L* de *Bacillus subtilis* prin enzima peritelului celular cu lizozim (muramidază E.C.3.2.1.17). În prezența EDTA un număr de bacterii devin susceptibile la acțiunea lizozimului special potestativ de acasă subțantă. Formele *L* au o mare sensibilitate la variațiile de presiune osmotică. Protoplastii și sferoplastii rezultati prin enzima peritelului celular se lizează din această cauză foarte ușor după ce sunt eliberați din sistemele enzimice continue.

6.1.4.3. Concentrații enzimatice continute.

Concentrarea mediilor de biosinteză este asemănătoare în principiu cu operația de evaporare practică în industria chimică — sistemele de încălzire ale evaporatoarelor fiind identice. Principalele deosebiri sînt deter-

7.2. DEZAGREGAREA CELULELOR DE MICROORGANISME

Când substanțele biologice active care interesează și care s-au format în cursul procesului de biosinteză sunt intracelulare, este necesară distrugerea membranei celulare semipermeabile și a peretelui protector în vederea recuperării componentelor respective. Această operație se realizează prin procedee de dezintegrare.

După natura agentului de dezagregare utilizat, procedeele de dezagregare ale celulelor microbiene se clasifică în:

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

Procedeele mecanice cuprind dezagregarea celulelor în mori coloidale sau în mori vibratoare, menținând un anumit raport de recirculare, până la dezagregarea totală a celulelor microbiene; 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, nemecanice, se poate efectua prin decompunere rapidă, prin înghețare lentă (datorită procedeu deosebit de eficace este aplicarea de vibrații ultrasonice suspensiei de celule. Vibrațiile cu frecvențe de cca 20 000 Hz determină disrupția membranelor microbiene.

Dezagregarea celulelor microbiene prin procedee chimice cuprinde distrugerea componentelor lipoproteice ale membranei celulare prin acțiunea detergenților cationici sau anionici sau a solvenților organici, determinând trecerea în fază lichidă a unor dintre componentele biologice active.

indusă prin atacul enzimatic. Astfel, liza celulelor bacteriene poate fi realizată prin acțiunea enzimelor microbiene care pot fi efectuată și prin tratarea N-acetilglucosamină și acidul N-acetilmuramic. Dezintegrarea biologică a

Dezintegrarea biologică a N-acetilmutamicilor este realizată de bacterii aerobice care pot fi de obicei a omogenatelor celulare. Astfel, este bine cunoscută descompunerea antibioticelor de fier uscat la 70°C, timp de 2-3 zile. Dezintegrarea microorganismilor de *Micrococcus hydrothermalis* poate fi realizată cu suc pancreatic, iar la testul muscular cu enzime proteolitice izolate din *Bacillus subtilis*. Dezintegrarea biologică a *E. coli* poate fi realizată cu bacteriofagi.

minute 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 însă utilizată decât în unități industriale mari datorită cheltuielilor ridicate de investiții (volum mare al instalației datorită destinderii vaporilor în vacuum, echipamente complexe de condensare, pompe de vid costisitoare etc.) și de întreținere (verificări frecvente, control riguros al îmbinărilor 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 concentrarea moderată (până la 20–30%) a substanțelor cu masă moleculară ridicată (proteine, enzime, hormoni) se practică cu succes procedeele de concentrare atermică — ultrafiltrarea și osmoza inversă.

Concentrarea și purificarea preparatelor enzimatice prin ultrafiltrare și osmoza inversă. Ultrafiltrarea reprezintă procesul de separare a componentelor unei soluții datorită diferențelor de volum molecular cu ajutorul unei membrane. Ultrafiltrarea reprezintă un procedeu ideal de separare și purificare a substanțelor biologice active, întrucât:

- permite efectuarea concentrărilor la temperaturi scăzute, micșorând fenomenele de autodigerare și pierderile de activitate prin denaturare termică;
- nu necesită modificări de fază (evaporări, condensări);
- nu utilizează substanțe chimice;
- permite purificarea substanțelor biologice active prin îndepărtarea unor componente cu volum molecular inferior;
- este ionică și pH-ul soluției care se concentrează rămân practic constante în timpul prelucrării.

Diagrama procesului de ultrafiltrare este dată în figura 4.31 în care C_F reprezintă concentrația substanței dizolvate în soluția de alimentare, C_M concentrația substanței dizolvate la suprafața membranei semipermeabile, iar C_P concentrația substanței dizolvate în permeat. Acumularea de substanță în zona membranei semipermeabile constituie fenomenul denumit **polarizare de concentrație** (fig. 4.30) determinând uneori precipitarea unui gel care mărește rezistența la trecerea fluxului de fluid. Sprețea grosimi stratului de gel mărește cantitatea de substanță dizolvată transportată din masa de lichid spre membrană până la creșterea unui echilibru dinamic cu cantitatea de substan-

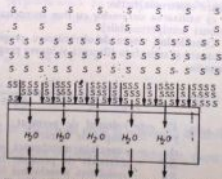


Fig. 4.30. Polarizarea de concentrație a substanțelor solubile reținute de membrana de ultrafiltrare.

7.3. CONCENTRAREA MEDIILOR DE BIOSINTEZĂ A ENZIMELOR

Mediile de biosinteză se concentrează prin operații specifice industriei chimice, cu deosebire că este necesară protejarea lichidelor biologice datorită termolabilității acestora. Se utilizează adeseori evaporarea în vacuum, care permite efectuarea operației la temperaturi relativ scăzute (25 ... 50°C).

La ultimul timp se practică cu succes procedeele de concentrare atermică, ultrafiltrarea și osmoza inversă.

Ultrafiltrarea reprezintă procesul de separare a componentelor unei soluții datorită diferențelor de volum molecular cu ajutorul unei membrane. Ultrafiltrarea este un procedeu de separare și purificare a substanțelor biologice active, având următoarele avantaje:

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

Cercările privind introducerea proceselor cu membrane urmăresc, în general, stabilirea posibilităților de utilizare eficientă a unor tipuri de membrane la concentrarea și purificarea produselor biologice active, în cadrul elaborării tehnologiilor de obținere a acestora.

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

În cadrul studiilor cercetătorilor stau două fenomene ce țin să limiteze performanțele utilizării membranelor în tehnicile de purificare:

- blocarea membranelor ("membrane fouling") prin adsorbție de solut, în special proteine;
 - polarizarea de concentrație (gel polarizare).
- Bazele teoretice ale explicării fenomenului de blocare a membranelor de ultrafiltrare datorită proteinelor au fost puse de Turker și Hubble. Ei menționează, în cazul fluxului transmembranal, un nivel al proteinelor asociate de membrană corespunzător unei izoterme de saturație cu un maxim la 207 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. În condițiile fluxului prin membrană, această concentrație crește până la o nouă valoare limită, independent de flux, dar depinzând de circulația tangențială a fluidului supus separării. Rezistența stratului de proteină adsorbit crește cu fluxul, grosimea depunerii concentrată și adsorbția prezintă un caracter reversibil cu regimul hidrodinamic. Reducerea la modelul gel-polarizării, s-a stabilit relația între fluxul de permeat și timp precum și parametrii ce depind de condițiile de operare (concentrația macro-solutului, diferența de presiune aplicată, coeficientul de permeabilitate) și de presiunea osmotică, difuzivitate.

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

- | | |
|---------------------|----------------|
| 1 — oxidoreductaze; | 4 — liaze; |
| 2 — transferaze; | 5 — izomeraze; |
| 3 — hidrolaze; | 6 — sintetaze. |

Cu toate acestea se împart în subclase și sub-subclase în funcție de unele detalii privind grupurile sușoare, transformările și natura cofactorilor implicați în reacția pe care o catalizează. Spre exemplu amiloglucosidaza are codul E. C.3.2.1.3.

5.2 Criterii pentru selectarea microorganismelor și enzimelor utile

Numărul preparatelor enzimatice utilizate în scopuri practice a crescut în ultimul timp datorită marilor avantaje pe care le prezintă transformarea diferitelor substanțe. Una dintre sursele cele mai importante de enzime pentru obținerea preparatelor enzimatice este reprezentată de microorganismele.

Microorganismele oferă mai multe avantaje față de sursele de enzime de origine animală și vegetală, deoarece pot fi obținute în cantități mari pe medii de cultură ieftine în instalații speciale. În acest fel cantitatea de preparat enzimatic nu este limitată de lipsa materiei prime, iar prețul de cost la care se pot obține le face competitive cu produsele similare din alte surse. Preparatul enzimatic sînt utilizate în scopuri practice sau științifice pentru catalizarea diferitelor reacții de hidroliză, oxidare, reducere, transfer (aminare, deaminare, acilare, fosforilare, glicozilare, metilare, condensare etc.), decarboxilare, racemizare, izomerizare.

Pentru selectarea unui microorganism care să producă enzima sau sistemul enzimatic dorit, trebuie mai întâi să se testeze dacă microorganismele luate în lucru pot să metabolizeze substanța și dacă printre reacțiile de metabolism se află și reacția sau reacțiile care produc transformarea dorită a substanței. În cazul cînd un microorganism îndeplinește aceste condiții, poate fi luat în lucru mai departe, selectarea efectuîndu-se după următoarele criterii:

- microorganismul să nu manifeste putere patogenă;
- să nu elaboreze endo-, exo-toxine, micotoxine (aflatoxine);
- să nu poarte activitate antibiotică sau potențial alergen;
- să producă cu precizie și în cantități mari enzima sau complexul enzimatic dorit; se preferă mutantele constitutive nerepresibile prin produs final;
- să se dezvolte autoprotejat pe medii de cultură ieftine;
- să elaboreze enzima sau enzimele intracelulare sau extracelulare conform utilizării celei mai eficiente a preparatului enzimatic;

se prelucrase ușor. Materiile prime folosite la fabricarea preparatelor enzimatice se pot fi de natură vegetală, animală sau microbiană. La plante, concentrații mari de enzime se pot întâlni în semințe, în boabe geminate, în fructe, frunze, rădăcini. La animale, enzimele se găsesc în cantități mari în diferite organe (rinichi, ficat, pancreas, mucusul stomacului).

O sursă foarte importantă de enzime utilizată frecvent pentru fabricarea preparatelor enzimatice 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 însușire în instalații speciale, pe medii de cultură ieftine. În acest fel, obținerea unor cantități mari de preparat enzimatic 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 mediile de cultură pe care se cultivă microorganismele sunt, de regulă, subproduse agricole sau și ale industriei alimentare.

Prima exploatare modernă a enzimelor de fermentație o datorăm lui Takamizawa, care, în 1894, a extras cu succes un amestec enzimatic din orez fermentat numit "koji" bogat în α -amilază și care s-a vîndut în Japonia ca un adăos digestiv de uz uman. Mai tîrziu, s-a înființat în Statele Unite producția de "tokadiantza".

La începutul secolului al XII-lea, Otto Rohm, în Germania, a descoperit că efectul de curățare a pielei cu ajutorul excremenților de câine și de porc se datorase enzimelor proteolitice pe care acestea le conțin. El a demonstrat ulterior arăt că acestea se pot obține și prin cultivarea fungilor în culturi de suprafață. Enzimele extrase din organismele supracitate și-au găsit foarte devreme numeroase aplicații. De exemplu, studiile asupra fenomenului de tîrșire la fabricarea berii a relevat importanța enzimelor din mîlț asupra mobilității glucidelor și proteinelor de rezervă. Aceasta a condus la utilizarea extractului de mîlț bogat în enzime și în alte domenii. Efectul de fîșgîre a cămii cu ajutorul plantelor tropicale *Carica* sau *Passiflora* plantă se cultivă special în acest scop. Alte enzime se extrag din diferite organe ale animalelor. Un exemplu de acest fel îl constituie tripsina și chimotripsina, care se extrag din pancreasul de porc. Alcooldehidrogenaza se extrage din ficatul de vacă, iar catalaza din ficatul de bovină. Alcooldehidrogenaza se extrage din organele de la animalele domestice par a fi mai economice față de produsele extractelor de microorganismele și în momentul de față o parte din cererea pentru enzime este satisfăcută de aceste preparate enzimatice extrase din

În continuare se tratează dinamica biosintezii α -amilazei, utilizând tulpini de *Bacillus subtilis*, după procedulul sumării, discontinuu și continuu. Procedeul culturii sumării s-a generalizat în prezent datorită faptului că la acea capacitate de producție necesită o suprafață construită mult mai mică, soluție mai simplă și o exploatare mai ușoară.

Obținerea cu regularitate a varietății de culturi cu un conținut ridicat în α -amilază depinde de starea fiziologică a microorganismului utilizat ca inocul și de parametrii de bioreactor: temperatură, pH, agitare, rată de aerare, durata culturii, caracteristicile fizico-chimice ale mediului nutritiv.

5.2.1.1. *Bacillus subtilis* este un germeni GRAM +, sporogen, strict aerob, rapid, posedând un pronunțat pleomorfizism. Sporul este termoresistent (trebuie 40 minute la 9.5 ATM sau câteva ore la 120°C caldură uscată). Temperaturile optime de dezvoltare cuprind între 28 ... 40°C, iar pH optim 6.0 ... 8.0. Este sensibil la bacteriofagi 2-DNA: F, AL, GA, SP50, PBSL.

Tulpinile de *Bacillus subtilis* prezintă fenomenul de dissociere $R \rightarrow S, P, M$, în anumite condiții. Forma R tipică este activă cu potențial enzimatic ridicat, în timp ce formele S, P, M sînt slab active sau inactive (fig. 5.26) (U. N. Derkoll, 1954, Bahmatova, 1978, 1979). Formele S, P, M se pot distinge între ele și după viteza și intensitatea sporulării, fiind posibilă și formarea variantelor asporogene (Hayward 1946).

Însoțirea dissocierei $R \rightarrow S, P, M$ este însoțită de pierderea capacității productive sau elaborat procede de limitare a variabilității tulpinilor de *Bacillus subtilis* (Säizman-Bitliv, 1970). Modalitățile de limitare a variabilității și de stabilizare genetică din selecția coloniilor de limitare a producției, supunerea culturii provenite din acestea unui șoc termic, limitarea și conservarea culturilor stoc la 4°C, utilizarea la fiecare șară a unui inocul preparat dintr-o soluție liofilizată, evitarea repărilor repetate.

Folosirea unui inocul de calitate asigură obținerea cu regularitate a producțiilor ridicate de α -amilază.

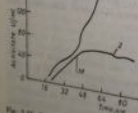


Fig. 5.26. Biosinteză a amilazei de către tulpinile R, S, P, M de *Bacillus subtilis*.
1 - tulpina R; 2 - tulpina S; 3 - tulpina P; 4 - tulpina M.

Diferențele dintre α -amilaze produse de *Bacillus amyloliquefaciens* și cele produse de *B. licheniformis* constau în compoziția diferită a hidrolizantului de amoniu obținut cu aceste enzime. Astfel, primul conține maltohexoză drept component major, în loc al doilea caz se obține un amestec de maltohexoză și maltoză.

În mod asemănător, în funcție de speciile bacteriene utilizată în procesul de biosinteză, compoziția în oligozaharide a produsului de reacție este diferită, deși, pe scară globală, gradul de hidroliză calculat prin determinarea cantității de glucide reduse obținute la urma hidrolizei enzimice raportate la cantitatea totală de substrat (amilon) utilizat este aproximativ același (20-25%).

În 1983, Fogarty a efectuat o recenzie completă a enzimelor microbiene care hidrolizează amidonul (tabelul 12.2).

12.2.1.2. Influența etapelor de cultivare a microorganismelor asupra biosintezii α -amilazei

Când tulpina productoare este cultivată în sistem discontinuu, enzima este produsă în mod normal după ce a atins faza maximă de creștere și începe faza staționară. S-au pus diferite ipoteze privind asocierea fazei de sporulare cu schimbările fiziologice. S-a constatat că, în timpul biosintezii enzimelor, are loc o represie prin catabolit, astfel încât nivelul de producție a enzimelor este limitat de concentrația sursei de carbon. În 1975, Saito și Yamamoto au demonstrat inducerea formării enzimelor de către amidon concomitent cu represia prin catabolit la *B. licheniformis*. Ei au selecționat mutanți rezistenți la represia prin catabolit. În 1984, proporțional cu viteza de creștere și este represată de concentrația în glucide reduse.

În final, majoritatea autorilor au acceptat ideea că biosinteză α -amilazelor are loc la sfârșitul fazei logaritmice, înainte de atingerea fazei staționare.

Producerea α -amilazelor cu tulpini de *Bacillus subtilis* este influențată de particularitățile morfofiziologice care au potențialul productiv al tulpinilor. Tulpinile de *Bacillus subtilis* prezintă fenomenul de dissociere $R \rightarrow S, P, M$ în condiții identice. Forma R tipică este activă cu potențial enzimatic ridicat, în timp ce formele S, P, M sînt slab active sau inactive. Aceasta impune o limitare a variabilității, prin selecția permanentă a coloniilor de tip R înalt productive, evitarea repărilor repetate și utilizarea de inocul preparat de fiecare dată din cultura nouă.

Dinamica asimptotică a α -amilazei în culturi sumării, în sistem discontinuu, este reprezentată în fig. 12.3, 12.4 și 12.5.

transfer de masă al oxigenului este mai bun. Aerul sterilizat în prealabil se insuflă sub o ușoară suprapresiune pentru prevenirea contaminărilor.

Cerințele totale de oxigen în timpul biosintezei α -amilazei au fost determinate pentru *B. subtilis* NRRL-B 3411 și estimate la ≈ 120 $\text{mM O}_2/\text{h}$ (Heltin & Ken 1971), iar pentru *B. subtilis* NCIB 3646 la $\approx 18 \text{ mM O}_2/\text{h}$ (Gandhi-Kjaergaard 1975), demonstrând mari variații ale necesarului de oxigen pentru tulpini diferite ale aceluși gen.

Influența ratei de aerare și vitezei de agitare este arătată în figura 5.31.

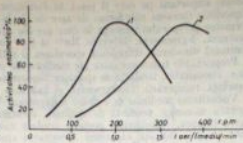


Fig. 5.31. Influența ratei de aerare și vitezei de agitare asupra biosintezei α -amilazei.

Fig. 5.32. Influența caracteristicilor fizico-chimice ale mediului nutritiv de biosinteză

Mediile de cultură utilizate pentru biosinteza enzimelor trebuie să conțină în diferite raporturi optime sursa de carbon și sursa de azot care pot juca rol de inductorii ai enzimelor, precursori, cofactori și microelemente. Producția de enzime a unei tulpini variază mult în funcție de mediul utilizat. *B. subtilis* NRRL-B 3411 produce considerabil mai multă protează neutră decât protează alcalină sau α -amilază, dar când este cultivat pe un mediu de făină de pește, producția de protează neutră este redusă în timp ce producția de protează alcalină este ridicată.

Mecanismele de inducție ale biosintezei α -amilazei pe medii sintetice par a fi identice și pentru mediile naturale, totuși activitatea amilolitică maximă se obține pe mediile naturale conținând amidon și extract de porumb.

Biosinteza α -amilazei este puternic indusă în prezența amidonului în mediile de cultură, el fiind substratul natural al enzimei. Maltoza, lactoza și galactoză favorizează de asemenea acumularea α -amilazei. Prezența glucinei în mediul de cultură are un efect puternic represor, inhibând parțial sau total biosinteza α -amilazei.

Biosinteza este inhibată de anacrobioză și de substanțe care decuplează procesul de fosforilare oxidativă (2, 4-dinitrofenolul). Pe lângă sursa de carbon care este și inductor specific pentru α -amilază, sursa de azot are o importanță deosebită sub raport cantitativ și calitativ.

Se pot utiliza ca surse de azot ingrediente naturale ca: grot de floarea soarelui, grot de soia, extract de porumb. *B. subtilis* este capabil să utilizeze proteinele, aminoacizii și chiar azotul amoniacal. Utilizarea surselor acidului azotos și azotei depinde de capacitatea fiecărei tulpini de a reduce nitrații și nitriți până la NH_4^+ .

S-a observat că mediile care conțin ca ingrediente majore amidon și fosfați de amoniu induc cel mai puternic biosinteza enzimelor amilolitice și proteolitice. Caracterul puternic inductor al ionilor amoniu și calciu s-a datorat

asemenea, s-au clonat fragmente de ADN din *B. subtilis* sau din *B. amyloliquefaciens*, s-au utilizat pentru mărimea cantității de α -amilază secretată.

În general, genul *Bacillus* produce α -amilaze, dar s-a găsit o enzimă din *B. neurothermophilus* care acționează mai mult ca o β -amilază decât ca o α -amilază.

12.2.1.5. Compoziția mediului și parametrii de biosinteză

Biosinteza α -amilazelor este influențată de compoziția mediului nutritiv și de condițiile de cultivare a microorganismului (temperatură, pH, durata fermentației). Ca sursă de carbon se pot utiliza diferite varietăți de amidon (tabelul 12.4). Cele mai bune rezultate se obțin în cazul utilizării glicogenului și a maltozozozilor. Maltozozozii sunt, de asemenea, utilizați. Dintre dizaharide, maltoza este utilizată, dar rezultatele sunt de cinci ori mai slabe decât în cazul utilizării glicogenului ca sursă de carbon. Dacă se utilizează monozaharide, se obțin cantități foarte mici de α -amilază.

Sursile de azot folosite sunt universale: săruri de amoniu, aminoacizi, caseină. Pentru *B. coagulans* se indică un mediu de cultură deosebit față de celelalte. De asemenea, pentru *B. licheniformis* s-a găsit că 3 vitamine și 7 aminoacizi sunt necesari pentru producerea α -amilazei în condiții optime. Biosinteza de enzime a unei tulpini variază mult în funcție de mediul utilizat. De exemplu, o tulpină de *B. subtilis* produce mai multă protează decât α -amilază, dacă este cultivată pe un mediu cu făină de pește sau grot de soia. Dacă se folosește un mediu pe bază de amidon, atunci este indusă biosinteza α -amilazei. Dacă în mediu este prezență glucosă, aceasta are un efect puternic represor, inhibând parțial sau total biosinteza α -amilazei.

În biosinteza amilazelor și proteazelor un rol important îl au ionii de calciu și amoniu, datorită implicării lor în sinteza acidului dipicolinic, intermediar în stabilizarea enzimelor.

În ceea ce privește temperatura de cultivare, 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. neurothermophilus* (tabelul 12.4).

Pentru unele tulpini producătoare de amilaze (tabelul 12.4), pH-ul optima variază între 6,0 și 7,5. Acesta poate fi controlat și menținut constant pe toată durata biosintezei. Prezența proteinelor în mediu îmbunătățește capacitatea de a reduce nitrații și nitriți și pH-ul se menține relativ constant.

Biosinteza α -amilazei este un proces intens aerob, iar oxigenul insuflat o însoțește aerul sterilizat nu poate fi utilizat direct în fază gazoasă, ci numai ca oxigen dizolvat. Necesarul de oxigen este dat de microorganism și mai ales de faza de dezvoltare în care se află acesta, biosinteza maximă de respirație situându-se în

4

5.6.4. Substratul și mecanisme ale atacului enzimatic

Substratul natural al celulozei este celuloza. Ea constituie componenta principală a pereților celulelor vegetale. Se găsește adesea în plante sub formă de fibre.

Termenul de celuloză nu desemnează un compus unitar, datorită marii variații a gradului de polimerizare al diferitelor celuloze, ei o categorie de substanțe cu molecule construite după același principiu variind considerabil prin mărimea lor. Celuloza nativă este întins amestecată cu cantități variabile de materii străine, înscrise ca: hemiceluloze, lignină, rășini, lipide, substanțe minerale.

Metoda convențională pentru controlul conținutului în celuloză cu grad de polimerizare mare constă în tratarea cu NaOH soluție 17,3% până la imbițibie. Partea insolubilă de numește α -celuloză și are grade de polimerizare mai mari de 100; din soluția alcalină prin precipitare cu acid acetic rezultă β -celuloza un hemiceluloză cu $n = 10 \dots 100$, iar în soluție rămâne γ -celuloza un amestec de oligosaharide cu $n < 10$.

Prin hidroliză cu acid clorhidric se formează celodextrine (celotetraza, celotriaza, celobioza) și glucoză. Puterea rotatorie mică a celodextrinelor precum și vâscozitatea mică de hidroliză demonstrează că resturile de glucoză, care le compun sînt legate β -glicozidice.

Prin urmare celuloza este compusă din macromolecule filiforme, în care resturile de D-glucopiranoză sînt unitate β -glicozidice. În pozițiile 1,4, prin atomi de oxigen și sînt rotite una față de altul cu 180°.

Macromoleculele celuloze sînt catene lineare foarte lungi neramificate și prezintă rezultate printr-o reacție de policondensare a dihidraridului celobiozei.

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

Macromoleculele de celuloză sînt așezate paralel, prin legături de H între grupările OH foarte numeroase, numai în anumite regiuni denumite *cristalite*, în alte regiuni macromoleculele au o așezare amorfă, neregulată lăsînd spații mari etc. Cu cît numărul cristalitelor sînt mai multe, cu atît rezistența mecanică și la hidroliză enzimatică a fibrei este mai mare.

Mai multe cristalite (numite și microfibrile sau micelle cu $O \approx 200 \text{ \AA}$) formează o fibră. Mai multe fibrele formează o fibră.

Gradul de polimerizare al celulozei native este de cel puțin 3000 la fibrele de m. iută, ramie.

În prezent, nu există încă o reprezentare unitară asupra modului și acțiunii complexelor enzimatie implicate în celuloză.

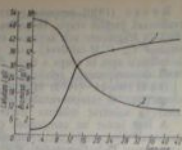


Fig. 5.76. Cinetica hidrolizei celulozei suspendate în soluție acidă de către microorganismul *Thermotoga maritima* (55°C, Yg 0.41 celuloză/celuloză; $1000,9 \text{ h}^{-1}$; $\alpha = 0.06 \text{ g celuloză/g celuloză}$)
1 — hidroliză, 2 — vâscozitate.

Tabelul 13.1

Bacterii productoare de celuloză	
Bacterii termofile	<i>Clostridium thermocellum</i>
Bacterii mezofile	<i>Cellviterio fulvus</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Ruminococcus sp.</i> <i>Cellulomonas sp.</i>

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

Fungii. În timpul celui de-al doilea război mondial, Armata Statelor Unite ale Americii a suferit pierderi severe ale echipamentului și uniformelor datorită atacului fungic în climatul cald și umed din Pacificul de Sud. Fungii care au contribuit la acest dezastru au fost recoltați și s-a alcătuit o colecție, din care s-a izolat și s-a caracterizat *Trichoderma reesei* (Reese și Mandel, 1984). Tulpinile cunoscute sub această denumire (de fapt provenite din *Trichoderma viride*) constituie moșagii cel mai studiat și probabil cel mai bun pentru biosinteza întregului sistem enzimatic celulozolic. Cu toate acestea, se va exemplifica și cu alte câteva specii de fungi care au fost selecționate de diferiți cercetători cu scopul declarat de a obține buni producători de celuloză: *Trichoderma koningii*, *Penicillium funiculosus*, *Penicillium tianshanense*, *Penicillium verruculosum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* etc.

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

Substratul natural al celuloazelor este celuloza. Ea constituie componenta principală a pereților celulei 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, hemicelulozele și ligninele.

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