

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ BUCUREȘTI**

FACULTATEA DE HORTICULTURĂ

**SPECIALIZAREA
„TEHNOLOGIA PRODUSELOR ALIMENTARE”**

**BIOTEHNOLOGII NOI DE OBTINERE A
UNOR HIDROLAZE UTIZABILE ÎN
INDUSTRIA ALIMENTARĂ**

TEZĂ DE DOCTORAT

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC,
PROF. DR. GHEORGHE CÂMPEANU**

**DOCTORAND,
ING. BOGDAN-ANDREI STERIAN**

**BUCUREȘTI
2005**

CUPRINS

LISTĂ DE ABREVIERI.....	pag. 1
CUPRINS.....	pag. 2
STUDIU DOCUMENTAR.....	pag. 6
INTRODUCERE	pag. 7
CAPITOLUL I - PROCESE BIOTEHNOLOGICE ÎN INDUSTRIA HIDROLIZATELOR DE AMIDON	pag. 9
1.1. Amidonul	pag. 9
1.2. Microorganisme și preparate enzimatiche	pag. 16
1.3. Tipuri de transformări enzimatiche suferite de amidon	pag. 21
1.4. Faza de laborator a elaborării tehnologiilor de biosinteză a amilazelor	pag. 24
1.4.1. Selecția microorganismelor producătoare de amilaze	pag. 25
1.4.2. Medii de cultură pentru microorganismele producătoare de α -amilază	pag. 26
1.4.3. Creșterea și multiplicarea microorganismelor	pag. 26
1.4.4. Dinamica multiplicării populațiilor bacteriene	pag. 27
CAPITOLUL AL II-LEA - PARTICULARITĂȚI ALE PRODUCERII ALFA-AMILAZEI MICROBIENE.....	pag. 29
2.1. Implicarea tehnicilor de inginerie genetică în producerea α -amilazei...	pag. 30
2.2. Caracteristici ale procedurii submers de producere a amilazelor	pag. 33
2.2.1. Importanța pH-ului, temperaturii și duratei de incubare	pag. 34
2.2.2. Importanța aerării și agitării	pag. 38
2.2.3. Importanța caracteristicilor fizico-chimice ale mediului de cultură.....	pag. 39
2.2.4. Importanța altor tehnici de bioproces	pag. 45
2.3. Caracteristici ale procedurii culturilor de suprafață pentru producerea amilazelor	pag. 47
CAPITOLUL AL III-LEA - PROPRIETĂȚI ALE UNOR AMILAZE MICROBIENE.....	pag. 51
3.1. Purificarea și caracterizarea preparatelor amilolitice obținute cu tulpini din genul <i>Bacillus</i>	pag. 51
3.2. Acțiunea α -amilazei asupra substratului	pag. 57
3.2.1. Mecanisme ale atacului enzimatic asupra amilazei, amilopectinei și amidonului	pag. 57
3.2.2. Hidroliza amilolitică a diferitelor substraturi. Inactivarea enzimatică	pag. 59
CAPITOLUL AL IV-LEA - IMPORTANȚA PENTRU INDUSTRIA ALIMENTARĂ A PRODUSELOR OBTINUTE PRIN HIDROLIZĂ ENZIMATICĂ.....	pag. 64
4.1. Amidonurile modificate.....	pag. 65
4.2. Dextrinele	pag. 66
4.3. Maltodextrinele	pag. 67

CAPITOLUL AL V-LEA - APLICAȚII INOVATIVE DE ULTIMĂ ORĂ ÎN DOMENIUL AMILAZELOR MICROBIENE	pag. 71
PARTE EXPERIMENTALĂ.....	pag. 75
CAPITOLUL AL VI-LEA - DINAMICA ACUMULĂRII ÎN CULTURILE SUBMERSE A α-AMILAZEI PRODUSĂ CU TULPINI DIN GENUL BACILLUS.....	pag. 76
6.1. Materiale și metode	pag. 76
6.1.1. Tulpini bacteriene	pag. 76
6.1.2. Medii de cultură	pag. 76
6.1.3. Pregătirea materialului de însămânțare. Inocularea mediilor	pag. 78
6.1.4. Condiții necesare dezvoltării culturii. Separare grosieră.....	pag. 78
6.1.5. Determinarea activității enzimatică a α -amilazei.....	pag. 78
6.1.6. Determinarea concentrației celulare	pag. 80
6.1.7. Determinarea glucidelor reducătoare	pag. 81
6.1.8. Identificarea calitativă și cantitativă a amidonului	pag. 82
6.2. Rezultate și discuții	pag. 83
6.3. Concluzii	pag. 93
CAPITOLUL AL VII-LEA - OPTIMIZAREA BIOSINTEZEI α-AMILAZEI PE BAZA ANALIZEI INFLUENȚEI DIVERȘILOR FACTORI.....	pag. 95
7.1. Materiale și metode	pag. 96
7.1.1. Pregătirea mediilor de cultură	pag. 96
7.1.2. Condiții de cultivare.....	pag. 97
7.1.3. Separarea lichidului de cultură de biomasa bacteriană	pag. 97
7.1.4. Determinarea activității enzimatică a α -amilazei	pag. 97
7.1.5. Determinarea concentrației celulare	pag. 97
7.1.6. Metodă de dozare a biosurfactanților	pag. 98
7.1.7. Metoda „suprafeței de răspuns” utilizată pentru optimizarea concentrației de macronutrienți	pag. 98
7.2. Rezultate și discuții	pag. 99
7.2.1. Influența mărimii, vârstei și modului de obținere a inoculului folosit	pag. 99
7.2.2. Influența vârstei celulelor și a lichidului de cultură	pag. 106
7.2.3. Influența sursei de carbon și a sursei de azot	pag. 107
7.2.4. Influența altor elemente plastice și a unor oligoelemente	pag. 125
7.2.5. Influența surfactanților sintetici și microbieni (biosurfactanți) ...	pag. 127
7.2.6. Influența glicinei și a altor substanțe adăugate în mediu	pag. 135
7.2.7. Influența pH-ului	pag. 138
7.2.8. Influența temperaturii	pag. 140
7.2.9. Influența agitării	pag. 144
7.2.10. Optimizarea componentelor mediului de cultură folosind metodologia „suprafeței de răspuns”	pag. 146
7.2.11. Noile formule de medii de cultură. Biocinetica comparativă a acumulării α -amilazei în culturile submerse	pag. 158
7.3. Concluzii	pag. 162

CAPITOLUL AL VIII-LEA - PURIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA PREPARATELOR BRUTE AMILOLITICE OBȚINUTE CU TULPINI DIN GENUL BACILLUS	pag. 165
8.1. Materiale și metode	pag. 165
8.1.1. Noile medii de cultură optimizate pentru biosinteza α-amilazelor bacteriene	pag. 165
8.1.2. Determinarea activității enzimatică a α-amilazei	pag. 166
8.1.3. Dozarea proteinelor prin metoda Lowry	pag. 167
8.1.4. Fraționarea proteinelor din preparatul brut cu activitate amilolitică prin precipitare cu acetonă	pag. 168
8.1.5. Analiza prin gel-cromatografie a preparatului amilolitic parțial purificat	pag. 169
8.1.6. Efectul pH-ului asupra activității și stabilității α-amilazei.....	pag. 171
8.1.7. Efectul temperaturii asupra activității și stabilității α-amilazei ...	pag. 171
8.1.8. Efectul ionilor metalici asupra activității și stabilității α-amilazei	pag. 171
8.1.9. Efectul surfactanților asupra activității și stabilității α-amilazei...	pag. 171
8.1.10. Testul toleranței la sare.....	pag. 172
8.2. Rezultate și discuții	pag. 172
8.2.1. Purificarea preparatelor brute amilolitice obținute cu tulpini din genul Bacillus	pag. 172
8.2.2. Caracterizarea enzimelor amilolitice purificate. Relația activitate-stabilitate	pag. 178
8.2.2.1. Efectul pH-ului asupra activității și stabilității α-amilazei	pag. 178
8.2.2.2. Efectul temperaturii asupra activității și stabilității α-amilazei	pag. 180
8.2.2.3. Efectul ionilor metalici și inhibitorilor asupra activității α-amilazei	pag. 183
8.2.2.4. Efectul surfactanților asupra activității și stabilității α-amilazei	pag. 190
8.2.2.5. Testul toleranței la sare	pag. 191
8.2.2.6. Stabilitatea pe termen lung a α-amilazelor	pag. 191
8.3. Concluzii	pag. 192
CAPITOLUL AL IX-LEA - PARTICULARITĂȚI ALE HIDROLIZEI AMILOLITICE A DIFERITELOR SUBSTRATURI UTILIZABILE ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ	pag. 194
9.1. Materiale și metode	pag. 194
9.1.1. Determinarea concentrației de glucide reducătoare	pag. 194
9.1.2. Determinarea concentrației de amidon rezidual	pag. 194
9.1.3. Determinarea capacității de adsorbție a α-amilazelor bacteriene pe granule de amidon	pag. 194
9.1.4. Stabilirea modelelor matematice de inactivare a enzimei	pag. 195
9.2. Rezultate și discuții	pag. 195
9.2.1. Aprecierea gradului de hidroliză	pag. 195
9.2.1.1. Aprecierea gradului de hidroliză prin determinarea concentrației glucidelor reducătoare	pag. 196

9.2.1.2. Aprecierea gradului de hidroliză prin determinarea concentrației amidonului rezidual	pag. 198
9.2.1.3. Aprecierea gradului de hidroliză prin măsurarea capacității de adsorbție a diferitelor tipuri de amidon	pag. 200
9.2.2. Analize privind cinetica de inactivare a enzimei	pag. 200
9.2.2.1. Efectul concentrației de enzimă asupra procesului de hidroliză	pag. 201
9.2.2.2. Efectul hidrolizatelor asupra procesului de hidroliză	pag. 202
9.2.2.3. Efectul maltozei asupra procesului de hidroliză	pag. 204
9.2.2.4. Efectul glucozei asupra procesului de hidroliză	pag. 205
9.2.2.5. Efectul unor solvenți organici asupra procesului de hidroliză	pag. 206
9.3. Concluzii	pag. 209
CAPITOLUL AL X-LEA - PRODUCEREA ȘI UNELE PROPRIETĂȚI ALE MALTODEXTRINELOR	pag. 210
10.1. Materiale și metode	pag. 210
10.1.1. Metodă de obținere a maltodextrinelor	pag. 210
10.1.2. Metoda Luff-Schoorl pentru determinarea echivalentului de dextroză (DE) a maltodextrinelor	pag. 211
10.1.3. Metoda de producere a gelului de maltodextrină	pag. 211
10.1.4. Analiza senzorială a unui sos de salată	pag. 211
10.2. Rezultate și discuții	pag. 212
10.2.1. Producerea diferitelor tipuri de maltodextrine	pag. 212
10.2.2. Eliminarea efectului de râncezire la maltodextrine	pag. 214
10.2.3. Testarea posibilităților substituiri în alimentație a anumitor grăsimi cu maltodextrine	pag. 216
10.3. Concluzii	pag. 216
CAPITOLUL AL XI-LEA - CONCLUZII GENERALE.....	pag. 218
BIBLIOGRAFIE.....	pag. 222
ANEXA 1.....	pag. 234

INTRODUCERE

Biotehnologia este o știință integrată, care utilizează cunoștințe de biochimie, microbiologie și inginerie genetică.

Biotehnologia are un rol extrem de important în industria alimentară. Însăși industria alimentară este o biotehnologie, pentru că materiile prime agroalimentare sunt produse biologice și, prin urmare, conservarea lor până la consum, în stare proaspătă (cazul fructelor și legumelor) sau până la industrializare (cazul tuturor produselor agroalimentare) implică controlul activității enzimelor proprii țesuturilor vegetale și animale sau a celor elaborate de microflora de contaminare [12].

Enzimele proprii țesuturilor vegetale și animale sunt esențiale în transformările pe care le produc în produsele agroalimentare: maturarea fructelor și legumelor, a cerealelor și făinurilor sau a diferitelor produse alimentare pe bază de cereale germinate, maturarea brânzeturilor, maturarea cărnii. Enzimele pot avea, însă, și rol deteriorativ, cu implicații în modificarea caracteristicilor senzoriale și a valorii nutritive a materiilor prime agroalimentare, până la prelucrarea termică a acestora.

Rolul microorganismelor este, de asemenea, hotărâtor. Unele dintre ele au acțiuni dăunătoare, iar altele prezintă un rol esențial în obținerea unor produse alimentare datorită acțiunii lor fermentative: produsele lactate acide, brânzeturi, bere, vin, spirt, pâine, salamuri crude, alimente fermentate din cereale și leguminoase. Microorganismele intervin și în fermentarea unor produse vegetale: varză, murături, măsline, castraveți, cacao etc.

Biotehnologiile în industria alimentară s-au dezvoltat impresionant prin folosirea enzimelor exogene (în industria: laptelui, berii, spirtului, amidonului, cărnii, sucurilor de fructe, zahărului, panificației etc.) și a culturilor starter (în industria: berii, laptelui, cărnii, panificației etc.). De asemenea se adaugă și obținerea, prin folosirea microorganismelor, a unor metaboliți secundari (alcool etilic, acetonă, acizi organici, aminoacizi etc.), precum și de biomasă alimentară și furajeră [12].

Cu ajutorul enzimelor microorganismelor se pot accelera procesele biochimice, se pot perfecționa procesele de producție, se poate îmbunătăți calitatea produselor alimentare și se poate mări gradul de diversificare a producției alimentare.

Hidrolazele reprezintă acea clasă de enzime ce catalizează scindarea hidrolitică a moleculelor de substrat sub acțiunea apei. Glicozidazele constituie o subclasă a hidrolazelor,

din care fac parte și amilazele, enzimele implicate în scindarea hidrolitică a legăturilor glicozidice din macromolecula glicogenului și amidonului [21].

Amilazele bacteriene obținute prin tehnica fermentației submerse erau inițial folosite în industria textilă. Ulterior, aceste enzime au fost utilizate în industria amidonului, înainte chiar de a fi folosite în industria detergenților (ce prezintă cea mai largă întrebuintare a enzimelor). Tipuri speciale de siropuri, care nu se puteau obține prin mijloacele chimice convenționale, erau fabricate în totalitate prin procese enzimatică. Punctul de cotitură l-a constituit obținerea amiloglucozidazei microbiene, astfel că amidonul putea fi hidrolizat complet până la glucoză, iar, puțin timp după aceea, hidroliza enzimatică a înlocuit hidroliza acidă în producerea glucozei. Ulterior, folosirea glucozizomerazei immobilizate a făcut posibilă producerea industrială a siropului de fructoză.

Astfel, industria hidrolizatorilor de amidon a devenit a doua ca importanță în ceea ce privește utilizarea enzimelor. Datorită numeroaselor produse obținute din amidon, eforturile de cercetare s-au axat asupra acestuia, iar biotehnologiile moderne ce folosesc tehnici de ultimă oră ale biologiei moleculare și ingineriei genetice s-au concentrat pe această industrie. Alături de progresele pe linie enzimatică, numeroase cercetări aplicative sunt necesare pentru a sprijini aria microbiologică.

Datorită eficienței, acțiunii specifice, înaltei purificări și standardizării, echipamentului simplu folosit, controlului ușor asupra reacțiilor enzimatică, respectiv stopării acestora la gradul de conversie dorit, enzimele sunt catalizatorii ideali pentru industria alimentară.

Această lucrare și-a propus să abordeze pe larg problematica unor hidrolaze, și anume a α -amilazelor bacteriene, pornind de la selectarea unor tulpini din genul *Bacillus*, înalt producătoare a acestor enzime, studierea, respectiv optimizarea caracteristicilor procedurii submers de obținere a acestor compuși bioactivi, purificarea și caracterizarea lor, precum și analiza particularităților hidrolizei amilolitice a diferitelor substraturi utilizabile în industria alimentară și a rolului anumitor produse astfel obținute.