

**Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară
București**

Facultatea de Horticultură

Teză de doctorat:

**Studii biotehnologice privind
obținerea de biomasă
microbiană cu rol probiotic**

**Conducător științific
Prof. Univ. Dr. Câmpeanu Gheorghe**

**Doctorand
Asist. Univ. Drd. Vamanu Emanuel**

București 2006

CUPRINS

INTRODUCERE	1
1. Microflora intestinală	2
1.1. Rolul microflorei intestinale	8
1.1.1. Metabolismul glucidic	8
1.1.2. Metabolismul proteic și azotat	9
1.1.3. Metabolismul lipidic	10
1.1.4. Metabolismul mineral și vitaminic	10
1.1.5. Efectele microflorei asupra anatomiei și fiziologiei tractusului digestiv	10
1.1.6. Protecția contra infecțiilor	11
1.1.7. Stabilitatea microflorei digestive	12
1.1.8. Microflora digestivă și colonizarea tractusului gastro – intestinal la om	13
1.1.9. Microflora digestivă a păsărilor de curte	18
1.1.10. Microflora digestivă la porcine	21
1.1.11. Microflora digestivă la bovine	23
1.1.12 Rolul microflorei din rumen	25
1.1.12.1. Bacteriile	25
1.1.12.2. Colonizarea tractului digestiv la rumegetoare	28
2. Criterii de selecție pentru microorganismele probiotice	29
2.1. Rezistența la condițiile in vivo în cursul tranzitului digestiv	33
2.2. Colonizarea tractusului digestiv și adeziunea de celulele intestinale	34
2.3. Activitatea antimicrobiană	34
3. Modul de acțiune al probioticelor	36
4. Bacteriile lactice și acțiunea lor probiotică	42
4.1. Cocii	43
4.2. Bacilii	45
5. Probiotice pe bază de tulpini de <i>Bacillus subtilis</i>	48
6. Probiotice pe bază de drojdii	52
6.1. Drojdiile cultivate pe medii cu etanol ca aliment - medicament	54
6.2. Drojdiile viabile ca medicament	55
7. Aspecte biotehnologice privind obținerea de biomasă microbiană cu rol probiotic	57
7.1. Model structural de creștere	58
7.1.1. Modelul Monod	58
7.1.2. Cinetica de inhibiție	59
7.1.3. Rata de consum a nutrienților	60
7.1.4. Stoichiometria creșterii aerobe a biomasei microbiene	61
7.1.5. Rata de consum a oxigenului	63

8. Cinetica proceselor biotehnologice pentru obținerea de biomasă microbiană	64
8.1. Cinetica în sistem discontinuu de cultivare	64
8.2. Cinetica în sistem continuu de cultivare	67
9. Viabilitatea și stabilitatea microorganismelor probiotice	68
10. Materiale și metode utilizate pentru realizarea părții experimentale	69
10.1. Microorganisme	69
10.2. Materiale și metode utilizate pentru studiul tulpinilor de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
10.2.1. Caracterizarea tulpinilor de drojdii	69
10.2.1.1. Material biologic	69
10.2.1.2. Medii de cultură	70
10.2.1.3. Determinarea procentului molar de guanină și citozină (%G+C)	71
10.2.1.3.1. Izolarea ADN cromozomal din tulpinile de drojdii	71
10.2.1.3.2. Verificarea purității și integrității ADN izolat	72
10.2.1.3.3. Determinarea procentului molar de guanină și citozină	73
10.2.2. Obținerea biomasei de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
10.2.2.1. Obținerea inocului în condiții de laborator	74
10.2.2.2. Procesul de fermentație în bioreactorul Biotech Braun	75
10.3. Materiale și metode utilizate pentru obținerea biomasei de <i>Bacillus subtilis</i> BAF1	77
10.3.1. Material biologic	77
10.3.2. Caracterizarea genetică a tulpinii <i>Bacillus subtilis</i> BAF1	78
10.3.3. Testarea potențialului enzimatic al tulpinii <i>Bacillus subtilis</i> BAF1	79
10.3.4. Controlul sterilității mediilor de cultură	80
10.3.5. Controlul purității culturilor	80
10.3.6. Obținerea biomasei sporulate de <i>Bacillus subtilis</i> BAF1	81
10.3.6.1. Obținerea inocului de laborator	81
10.3.6.2. Faza de bioproces	82
10.3.6.3. Studii pentru stabilirea unui mediu standard	82
10.4. Materiale și metode utilizate pentru obținerea de biomasă probiotică de <i>Lactobacillus plantarum</i> 2s	83
10.4.1. Materiale și metode biologice	83
10.4.1.1. Material biologic	83
10.4.1.2. Medii de cultură	84
10.4.1.3. Identificarea tulpinii de <i>Lactobacillus sp. 2s</i>	85
10.4.1.4. Determinarea antibioretistenței	86
10.4.1.5. Analize genetice asupra ADN cromozomal	86
10.4.2. Metode tehnologice	86
10.4.2.1. Obținerea inocului de laborator	87
10.4.2.2. Cultivarea în bioreactorul Biotech Braun	87
10.4.2.3. Obținerea unui produs original de tip biopăstură pe bază de polen, miere și biomasă de <i>Lactobacillus plantarum</i> 2s	88
10.5. Materiale și metode utilizate pentru obținerea de biomasă probiotică	

de <i>Lactobacillus acidophilus</i> 1a	88
10.5.1. Materiale și metode biologice	88
10.5.1.1. Material biologic	88
10.5.2. Medii de cultură	89
10.5.3. Obținerea preinoculului	89
10.5.4. Cultivarea la nivel de laborator, obținerea inoculului	89
10.5.5. Cultivarea în bioreactorul Biotech Braun	90
10.5.6. Verificarea încadrării taxonomice	91
10.5.6.1. Izolarea și purificarea ADN cromozomal	91
10.5.6.2. Izolarea și purificarea ADN plasmidial	92
10.5.6.3. Verificarea purității și integrității ADN	92
10.5.6.4. Verificarea electroforetică a ADN	93
10.5.6.5. Tehnica RFLP pe ADN plasmidial	94
10.5.6.6. Analiza de restricție a ADN plasmidial	96
10.6. Materiale și metode utilizate pentru obținerea de biomasă proteică de <i>Hansenula polymorpha</i> 6	96
10.6.1. Medii de cultură și caracteristici de creștere	96
10.6.2. Cultura stoc	97
10.6.3. Obținerea subculturilor proaspete	97
10.6.4. Obținerea preinoculului la flacoane agitate	98
10.6.5. Obținerea inoculului la flacoane agitate	98
10.6.6. Fermentația în sistem batch în vasul LKB	99
10.7. Metode analitice	100
10.7.1. Dozarea etanolului	100
10.7.2. Determinarea densității optice	101
10.7.3. Determinarea biomasei uscate DCW (Dry Cell Weight)	102
10.7.4. Determinarea pH soluției	102
10.7.5. Determinarea numărului de spori din mediul fermentat și biomasa sporulată	103
10.7.6. Determinarea producerii de acid lactic	103
10.7.7. Determinarea cantității de lactat de Ca	104
10.7.8. Determinarea cantității de glucide consumate	104
10.7.9. Dozarea metanolului din mediul de cultură	105
10.7.10. Dozarea potasiului din mediul de cultură prin spectrometrie de emisie atomică	106
10.7.11. Determinarea fosforului din mediul de cultură	106
10.8. Metode și tehnici de separare a biomaselor probiotice	107
10.8.1. Separarea biomasei bacteriene sporulate de <i>Bacillus subtilis</i> BAF1	107
10.8.1.1. Uscarea biomasei prin atomizare	107
10.8.2. Separarea și uscarea biomasei proteice de <i>Hansenula polymorpha</i> 6	107
10.8.3. Liofilizarea biomasei de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 224, 225, 226, <i>Lactobacillus plantarum</i> 2s și <i>Lactobacillus acidophilus</i> 1a	108
10.9. Proiect fișă analitică pentru produsul probiotic pe bază de biomasă de drojdii și bacterii	109
10.10. Studiu farmacologic	115
10.10.1. Studiul antibioretistenței	115
10.10.2. Studiul antagonismului microbial	115

10.10.3. Studii de toxicitate	116
10.10.3.1. Toxicitatea acută la șoareci	116
10.10.3.2. Toxicitatea subacută	116
10.10.4. Stabilirea efectului specific de normalizator biologic al florei saprofite intestinale	117
10.10.5. Cinetica dezvoltării microbiene la nivel intestinal	117
10.10.6. Testarea valorii nutritive a biopăsturii	118
10.11. Metode de calcul al parametrilor cinetici	119
10.11.1. Determinarea valorii vitezei specifice maxime de creștere celulară, μ_{max}	119
10.11.2. Metoda statistică pentru calcularea vitezei specifice de creștere celulară, μ	119
10.11.3. Determinarea timpului de dublare a concentrației celulare (T_D)	120
10.11.4. Determinarea randamentului de substrat	120
10.11.5. Determinarea ratei de diluție	121
10.11.6. Determinarea productivității celulare	121
11. Rezultate și Discuții	122
11.1. Proces biotehnologic de obținere a biomasei probiotice pe bază de drojdii	122
11.1.1. Identificarea tulpinilor de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	122
11.1.2. Obținerea biomasei proteice	130
11.1.3. Studii biotehnologice privind obținerea de biomasă proteică pe bază de drojdii la nivel pilot	133
11.1.3.1. Subcultivarea drojdiilor pe mediu solid	133
11.1.3.2. Obținerea inoculului I în condiții de laborator	134
11.1.3.3. Obținerea inoculului II în microfermentatorul LKB	135
11.1.3.4. Procesul de fermentație pilot în bioreactorul F2/1	136
11.1.3.5. Caracteristicile culturii de drojdii pe parcursul celor 3 șarje	137
11.2. Proces biotehnologic de obținere a biomasei sporulate de <i>Bacillus subtilis</i> BAF1	143
11.2.1. Caracteristicile biochimice ale tulpinii <i>Bacillus subtilis</i> BAF1	143
11.2.2. Obținerea de biomasă sporulată	144
11.2.2.1. Faza de inocul	144
11.2.2.2. Faza de bioprocess	145
11.3. Proces biotehnologic de obținere a biomasei probiotice pe bază de <i>Lactobacillus plantarum</i> 2s	146
11.3.1. Identificarea	146
11.3.2. Determinarea procentului molar de G+C	148
11.3.3. Obținerea biomasei	150
11.3.4. Studii privind obținerea unui produs original pe bază de polen și miere și <i>Lactobacillus plantarum</i> 2s	156
11.4. Proces biotehnologic de obținere a biomasei proteice <i>Hansenula polymorpha</i> 6	160
11.4.1. Obținerea inoculului de laborator la flacoane agitate	162
11.4.2. Cultivarea în sistem batch a tulpinii <i>Hansenula polymorpha</i> în bioreactorul JAR	162
11.5. Proces biotehnologic de obținere a biomasei probiotice pe bază de <i>Lactobacillus acidophilus</i> 1a	165
11.5.1. Caracterizarea morfo-fiziologică	165
11.5.2. Determinarea procentului molar de G+C la <i>Lactobacillus acidophilus</i> 1a și <i>Bacillus subtilis</i> BAF1	166
11.5.3. Profilul plasmidial al tulpinilor de <i>Lactobacillus acidophilus</i> și <i>Bacillus subtilis</i> BAF1	169
11.5.4. RFLP și ADN plasmidial	170

11.5.5. Evoluția tulpinii <i>Lactobacillus acidophilus</i> 1a la nivel de laborator	171
11.6. Produs probiotic original pentru nutriția animală	176
11.6.1 Studii farmacologice	180
11.6.1.1. Studiu microbiologic	180
11.6.1.2. Studiul antibioretistenței	181
11.6.1.3. Studiul antagonismului microbial	182
11.6.1.4. Studii de toxicitate	183
11.6.1.4.1. Toxicitatea acută la șoareci	183
11.6.1.4.2. Toxicitatea subacută	183
11.6.1.5. Stabilirea efectului specific de normalizator biologic al florei saprofite intestinale	186
11.6.1.6. Cinetica dezvoltării microbiene la nivel intestinal	191
11.7. Obținerea unui preparat probiotic original de uz uman	192
11.7.1. Testarea valorii nutritive a biopăsturii	192
12. Concluzii	197
13. Bibliografie	202
Listă de lucrări	214

Introducere

Termenul de probiotic derivă din două cuvinte grecești „pro” și „bios” și semnifică „în formarea vieții”, în opoziție cu termenul de antibiotic care înseamnă „contra vieții”. Acest termen a fost propus pentru prima dată de Parker în 1974 pentru a desemna microorganisme și substanțe care contribuie la menținerea echilibrului microflorei intestinale. Această definiție foarte vastă înglobează culturi microbiene, dar și metaboliți produși de microorganisme și, în consecință, și obținerea de antibiotice. [1, 2]

De aceea, Fuller în 1989 a redefinit probioticele ca fiind preparate ce conțin microorganisme vii utilizate ca aditivi alimentari și care au o acțiune benefică asupra sănătății animalelor prin ameliorarea digestiei și a igienei intestinale. [3, 4]

În prezent, majoritatea cercetătorilor acceptă că probioticele sunt concentrate viabile și atent selecționate de bacterii acido – lactice adesea compuse din tipuri de *Lactobacillus acidophilus* și *Streptococcus faecium* ori tipuri de *Bacillus*. Acestea sunt folosite pe scară largă în hrană cu scopul de a preveni tulburările digestive și/sau să crească performanțele zootehnice. [2, 5]

În alte studii, probioticele sunt definite ca „bacterii intestinale naturale care, după administrarea orală a dozelor, sunt capabile să se stabilească, eventual să se colonizeze în tractul digestiv și să păstreze sau să determine creșterea florei naturale a tractului digestiv pentru a preveni colonizarea cu organisme patogene și asigurarea optimă a hranei”. [6, 7, 8]

În cadrul țărilor aparținând CEE, în grupul produselor probiotice sunt incluse și drojzii, enzime și alte substanțe cu rol probiotic, astfel încă din anul 1988 existau cel puțin 20 preparate biologice diferite având la bază microorganisme aparținând genurilor: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, precum și enzime (lactoperoxidaza, gluconaza, enzime nespecifice), extracte de rumen. [5, 9, 10]

S-a observat că 90% din cele 10^{14} celule ale corpului uman sunt microorganisme și o mare parte din ele se găsesc în intestinul gros. Un număr de 10^{11} /g microorganisme se găsesc în fecale. [11, 12, 13]

Câteva sute de specii de bacterii se găsesc în intestinul gros în condiții normale. Majoritatea microorganismelor sunt anaerobe, ele având toleranță la O₂, care variază de la bacteroide și bifidobacterii relativ tolerante la O₂, la bacterii metanogene strict anaerobe. [14]

Bacteriile anaerobe depășesc numărul speciilor aerobe (~ 1000). Multe studii au arătat că microorganismele Gram negative aparținând grupului *Bacteroides fragilis* reprezintă bacteriile predominante din colon (~ 30% din totalul bacteriilor anaerobe). Alte grupuri conțin microorganismele Gram pozitive, coci. Predominante în acest grup sunt bifidobacteriile (~ 25% din flora intestinală) ca *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, predominante la adulți. [15, 16, 17]