

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
RECTORATUL

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de 26.02.2021 la ora 9.30 în <http://meet.google.com/gph-ejzi-uky>, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

"STUDIUL UNOR PROCESSE FERMENTATIVE ÎN SISTEME POLIFAZICE GAZ-LICHID-LICHID-SOLID"

elaborate de doamna **Dăncescu Corina Paraschiva (căs.Ciobanu)** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|---|------------------------|
| 1. Prof. Univ. Dr. Teodor Maluțan, Universitatea Tehnică "Gh Asachi" Iași | președinte |
| 2. Prof. Univ. Dr. Dan Cașcaval, Universitatea Tehnică "Gh Asachi" Iași | conducător de doctorat |
| 3. Prof. Univ. Dr. Anca Irina Galaction, Universitatea de Medicină și Farmacie "Grigore T. Popa" Iași | referent oficial |
| 4. Prof. Univ. Dr. Florin Dan Irimie, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca | referent oficial |
| 5. Prof. Univ. Dr. Ioan Mamaligă, Universitatea Tehnică "Gh Asachi" Iași | referent oficial |

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică online a tezei de doctorat accesând link-ul: <http://meet.google.com/gph-ejzi-uky>.

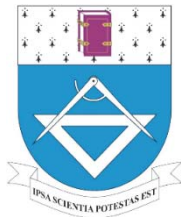
RECTOR,

Prof. univ. dr. Ing. Dan CAȘCAVAL



Secretar universitate,

Ing. Cristina Nagiț



**UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI**



STUDIUL UNOR PROCESSE FERMENTATIVE ÎN SISTEME POLIFAZICE GAZ-LICHID-LICHID-SOLID

Rezumatul tezei de doctorat

Candidat: Doctorand Dăncescu Corina Paraschiva (căs. Ciobanu)

Conducător de doctorat: Prof. univ. dr. ing. Dan Cașcaval

IAȘI, 2021

CUPRINS
REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

INTRODUCERE 5

PARTEA INTRODUCATIVĂ

CAPITOLUL I

Stadiul actual al cercetărilor în domeniul sistemelor de fermentație tetrafazice 7

I.1. Considerații generale asupra transferului de masă al oxigenului 7

I.2. Utilizarea oxigen-vectorilor, metodă neconvențională de transfer de masă al oxigenului .. 8

I.3. Sisteme tetrafazice de fermentație 11

I.4. Modele matematice pentru predicția $k_L a$ 11

I.5. Concluzii 12

PARTEA EXPERIMENTALĂ

CAPITOLUL II

Obiective principale 13

CAPITOLUL III

Tehnica experimentală 13

III.1. Echipamente 13

III.2. Microorganisme și reactivi 14

III.2.1. Microorganisme 14

III.2.2. Reactivi 15

III.3. Metode de măsurare și analiză 16

CAPITOLUL IV

Studiul distribuției vitezei transferului de masă al oxigenului în diferite lichide de fermentație în prezența n-dodecanului cu rol de oxigen-vector 17

IV.1. Lichide de fermentație simulate 19

IV.2. Suspensii de *Propionibacterium shermanii* 21

IV.3. Suspensii de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
IV.4. Corelații pentru distribuția vitezei de transfer al oxigenului	24
IV.5. Concluzii	26

CAPITOLUL V

Studiul influenței n-dodecanului asupra eficienței biosintezei ergosterolului	27
V.1. Tehnica experimentală.....	27
V.2. Sistemul de fermentație discontinuă.....	28
V.3. Sistemul de fermentație semicontinuă.....	30
V.4. Corelații matematice pentru biosinteza ergosterolului în prezența oxigen-vectorului	33
V.5. Concluzii.....	34

CAPITOLUL VI

Studiul influenței oxigen-vectorului asupra eficienței biosintezei acidului fumaric	35
VI.1. Tehnica experimentală	35
VI.2. Sisteme de fermentație aerobă fără oxigen-vector	36
VI.3. Sisteme de fermentație aerobă cu oxigen-vector.....	38
VI.4. Concluzii	42

CAPITOLUL VII

Studiul influenței n-dodecanului asupra eficienței biosintezei β-galactozidazei	43
VII.1. Tehnica experimentală	43
VII.2. Metode de analiză și măsurare.....	43
VII.3. Modelarea parametrilor biosintezei β -galactozidazei în prezența oxigen-vectorului în sistemele bazate pe rețele neuronale.....	44
VII.4. Sisteme de fermentație aerobă cu oxigen-vector	44
VII.5. Sisteme bazate pe rețele neuronale și algoritmi de optimizare inspirați din comportamentul de alimentație al bacteriilor pentru biosinteza β -galactozidazei în prezența oxigen-vectorului.....	47
VII.6. Concluzii	47

CONCLUZII FINALE	48
-------------------------------	----

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ȘI A PARTICIPĂRILOR ÎN CADRUL CONFERINTELOR NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE	54
---	----

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	56
-------------------------------------	----

INTRODUCERE

Caracteristicile cu importanță biotehnologică ale microorganismelor stau la baza multor procese de biosinteză. Pentru a le oferi posibilitatea manifestării acestor însușiri este esențială elaborarea și conducerea unor procese de biosinteză care să le asigure cele mai propice condiții corespunzătoare funcțiilor și caracteristicilor lor biologice. Optimizarea continuă a bioproceselor reprezintă astfel o prioritate în domeniu, iar aceste direcții de interes plasează teza de doctorat în contextul preocupărilor actuale și permite, prin originalitatea rezultatelor obținute, formularea și comunicarea unor date cu privire la utilizarea sistemelor de fermentație polifazice, în vederea asigurării unei oxigenări cât mai eficiente al lichidului de fermentație, precum și asigurarea unui transfer de masă corespunzător al oxigenului, specific fiecărui microorganism utilizat.

În acest context, partea experimentală a tezei de doctorat a avut ca obiectiv principal realizarea unor procese de fermentație aerobă în bioreactoare cu amestecare mecanică și utilizarea în cadrul biosintezelor a metodelor neconvenționale de transfer de masă al oxigenului prin intermediul oxigen-vectorului, cu scopul unor posibile optimizări ale proceselor de biosinteză. Pentru analiza potențialului efect pozitiv al utilizării oxigen-vectorului în cadrul acestor procese de biosinteză s-au folosit diferite criterii cum ar fi: consumul substratului, analiza dezvoltării biomasei, analiza concentrației compușilor de biosinteză în raport cu dezvoltarea biomasei, precum și analiza eficienței distribuției și a vitezei transferului de masă al oxigenului în lichidele de biosinteză în raport cu oxigen-vectorul.

Pe baza datelor experimentale obținute s-au elaborat câteva corelații matematice care au stabilit condițiile optime pentru o productivitate sporită a compușilor biosintetizați în bioreactoarele cu amestecare mecanică utilizate. A fost dezvoltat de asemenea și un model neuronal pentru un proces de fermentație realizat, model care combină sistemele bazate pe rețele neuronale artificiale (RNA) și algoritmi de inspirație biologică dezvoltați pentru modelarea și optimizarea unor procese chimice complexe și anume algoritmi de optimizare inspirați din comportamentul bacteriilor (BIA).

Teza de doctorat este structurată pe două părți principale, șapte capitole și conține 67 de figuri, 5 tabele, 59 de ecuații matematice și 229 de referințe bibliografice.

Prima parte a tezei de doctorat reprezintă o sinteză a datelor din literatura de specialitate cu privire la aspectele actuale de cercetare pe plan mondial în cadrul domeniului de interes, care evidențiază transferul de masă al oxigenului în cadrul proceselor de fermentație (mecanisme și căi specifice de transfer, cuantificarea procesului prin analiza coeficientului volumic de transfer de masă al oxigenului), precum și eficiența utilizării în cadrul biosintezelor a compușilor cu rol de oxigen-vectori.

Contribuțiile originale cu privire la studiul unor procese de fermentație în sisteme polifazice gaz-lichid-lichid-solid sunt cuprinse în cea de-a doua parte a tezei, în capitolele II-VII.

În capitolul II sunt prezentate, succint, obiectivele principale ale studiilor experimentale realizate, iar capitolul III cuprinde tehnica de lucru, echipamentele, materialele și metodele experimentale utilizate.

Capitolul IV urmărește studiul distribuției pe verticală a vitezei transferului de masă al oxigenului în diferite lichide de fermentație în prezența n-dodecanului. Acest studiu a fost realizat prin intermediul analizei coeficientului de transfer de masă al oxigenului și prin intermediul analizei factorului de amplificare pentru lichide de fermentație simulate cu diferite vâscozități și pentru lichide de fermentație reale cu diverse microorganisme, la diferite puteri specifice.

Experimentele au fost realizate într-un bioreactor cu amestecare mecanică, iar pentru analiza distribuției vitezei de transfer al oxigenului în interiorul lichidului de fermentație, electrodul de oxigen a fost introdus în patru poziții diferite, dispuse vertical în bioreactor începând cu partea inferioară al acestuia spre cea superioară. Datele experimentale obținute pentru lichidele de fermentație studiate au stat la baza unor modelări matematice care descriu și stabilesc influența principalilor parametri ai procesului asupra coeficientului de transfer de masă al oxigenului pentru cele patru poziții alese aleatoriu din interiorul lichidului de fermentație.

În Capitolul V sunt descrise și analizate procesele de fermentație discontinuă și semicontinuă cu *Saccharomyces cerevisiae* într-un bioreactor cu amestecare mecanică din punct de vedere al influenței n-dodecanului asupra eficienței biosintezei ergosterolului. Și în acest caz, influența principalilor parametri ai procesului de biosinteză (viteza aerării și concentrația oxigen-vectorului) asupra concentrației finale de produs biosintetizat (ergosterol) a fost analizată din punct de vedere matematic.

Capitolul VI cuprinde studiul obținerii prin biosinteză al acidului fumaric cu *Rhizopus oryzae* în sisteme tetrafazice de fermentație. Studiile au avut în vedere influența fracției volumice a oxigen-vectorului asupra cantității produsului final, influența concentrației n-dodecanului asupra vitezei de transfer de masă al oxigenului, precum și peletul ca formă optimă de agregare ale hifelor microorganismului utilizat.

Capitolul VII este dedicat studiului îmbunătățirii biosintezei și a activității enzimatică a β -galactozidazei în fermentații aerobe cu *Escherichia coli* în prezența n-dodecanului. Studiile au urmărit, prin comparație, influența utilizării oxigen-vectorului în diferite concentrații asupra acumulării biomasei și a activității enzimatică în cadrul fermentațiilor. De asemenea, s-a analizat și influența concentrației oxigen-vectorului asupra vitezei specifice de creștere, a coeficientului de utilizare al substratului și al conținutului proteic. Pe baza datelor experimentale obținute, procesul de biosinteză al β -galactozidazei a fost modelat utilizând o metodologie care combină rețelele neuronale artificiale cu algoritmi inspirați din comportamentul bacteriilor (BIA).

Rezultatele acestor cercetări s-au concretizat în elaborarea și publicarea a șase lucrări științifice în reviste cotate ISI și opt participări la sesiuni științifice naționale și internaționale.

Înainte de a trece la prezentarea rezultatelor obținute, folosesc acest prilej pentru a aduce mulțumiri celor care m-au sprijinit și m-au îndrumat cu toată priceperea în demersul meu științific: Domnului Profesor univ. dr. ing. Dan Cașcaval și Doamnei Profesor univ. dr. ing. Anca-Irina Galaction cu ajutorul cărora, în timpul studiilor doctorale, am parcurs o parte din drumul studiului sistemelor de fermentație tetrafazice și influența deosebită a oxigen-vectorilor asupra proceselor de biosinteză; membrilor comisiei de referenți științifici: Domnului Prof. univ. dr. ing. Teodor Măluțan, Universitatea Tehnică "Gh Asachi" Iași, Domnului Prof. univ. dr. ing. Florin Dan Irimie, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, Domnului Prof. univ. dr. ing. Ioan Mămăligă, Universitatea Tehnică "Gh Asachi" Iași, pentru disponibilitatea de a face parte din cadrul acestei onorante comisii; membrilor comisiei de îndrumare: Doamnei Șef lucrări dr. ing. Alexandra Cristina Blaga, Doamnei Șef lucrări dr. bioing. Lenuța Kloetzer, Doamnei Șef lucrări dr. ing. Alexandra Tucaliuc și Doamnei Șef lucrări dr. bioing. Mădălina Poștaru pentru directă și permanenta îndrumare, pentru sugestiile și recomandările oferite de-a lungul timpului; Domnului Șef lucrări dr. Marius Turnea, pentru ajutorul oferit cu privire la partea de modelare matematică a tezei de doctorat; întregii echipe de cercetare din cadrul Facultății de Inginerie Chimică și Protecție a Mediului "Cristofor Simionescu", Departamentul Inginerie Organică, Biochimică și Alimentară, pentru sfaturile, încurajările și disponibilitatea în vederea desfășurării optime a activităților de cercetare.

De asemenea, îmi îndrept întreaga recunoștință către toți colegii mei, doctoranzi în cadrul aceleiași echipe, pentru ajutorul oferit în vederea realizării părții experimentale a tezei.

Nu în ultimul rând, adresez mulțumiri și recunoștință colegilor de la Universitatea de Medicină și Farmacie "Grigore T. Popa", Iași, Facultatea de Medicină, disciplina de Biochimie pentru ajutorul oferit în perioada de parcurgere a studiilor doctorale și de elaborare a tezei de doctorat.

PARTEA INTRODUCIVĂ

CAPITOLUL I

Stadiul actual al cercetărilor în domeniul sistemelor de fermentație tetrafazice

I.1. Considerații generale asupra transferului de masă al oxigenului

În cadrul proceselor de biosinteză aerobă, oxigenul este o componentă fundamentală în etapele de dezvoltare ale biomasei, iar asigurarea necesarului de oxigen în cantități optime constituie un element cheie al acestor procese. Oxigenul reprezintă, așadar, unul dintre componentele de bază al lichidului de fermentație, motiv pentru care realizarea unui transfer de masă eficient reprezintă un aspect deosebit de important.

În soluțiile apoase oxigenul are o solubilitate foarte scăzută, motiv pentru care găsirea unor modalități cât mai eficiente de utilizare al acestuia în lichidul de fermentație reprezintă o provocare continuă.

Astfel, transferul oxigenului prin toate fazele unui sistem de biosinteză poate fi considerat etapa limitativă a întregului proces. Eficiența aerării depinde de viteza de dizolvare al oxigenului în lichidul de fermentație, respectiv de asigurarea necesarului de oxigen a biomasei.

Alături de parametrii constructivi și operaționali ai sistemului de aerare-agitare, caracteristicile reologice ale lichidului de fermentație, tipul și comportamentul specific al microorganismelor asigură eficiența acestor etape de transfer de masă al oxigenului [Garcia-Ochoa *et al.*, 2009, Dumont *et al.*, 2003].

În sistemele de fermentație aerate, transportul oxigenului dinspre bula de aer către microorganism reprezintă succesiunea unor etape de difuzie a oxigenului pornind de la filmul de aer situat la interfața aer-lichidul de fermentație, până la suprafața membranei celulare și reacția biochimică de consum al oxigenului de către microorganism. Toate aceste etape constituie procesul de dizolvare a oxigenului în lichidul de fermentație.

În fermentațiile aerobe, dizolvarea optimă a oxigenului în lichidul de fermentație este un factor esențial. Pe măsura creșterii și dezvoltării biomasei, viteza consumului de oxigen crește. Valoarea maximă a vitezei de consum al oxigenului coincide, de obicei, cu momentul atingerii unei concentrații ridicate a biomasei [Sorenson *et al.*, 2010, Cașcaval *et al.*, 2007].

De-a lungul timpului însă au fost propuse numeroase modalități de îmbunătățire a eficienței procesului de transfer de masă al oxigenului. O modalitate este creșterea debitului de aer, însă intensificarea aerării poate conduce la o serie de inconveniente, cum ar fi evaporarea mai rapidă a unor constituenți volatili ai lichidului de fermentație, creșterea cantității de spumă sau distrugerea microorganismelor. O altă modalitate propusă pentru un transfer cât mai eficient al oxigenului de la bulele de aer către biomasă este intensificarea puterii specifice [Galaction *et al.*, 2005] însă, și în acest caz, distrugerea celulară a biomasei reprezintă un inconvenient important.

Dimensiunea bulelor de aer este un alt factor cheie, care poate influența transferul de masă al oxigenului, ca urmare a controlului ariilor interfaciale de contact dintre cele două faze, gazoasă și lichidă [Sonnleitner *et al.*, 1997].

Avându-se în vedere toate aceste aspecte legate de îmbunătățirea procesului de transfer de masă al oxigenului, cu potențiale efecte negative asupra biomasei, o posibilitate de îmbunătățire a coeficientului volumic de transfer este adăugarea în lichidul de fermentație a unui compus care să faciliteze transportul oxigenului din faza gazoasă către faza lichidă și, ulterior, spre biomasă.

I.2. Utilizarea oxigen-vectorilor, metodă neconvențională de transfer de masă al oxigenului

Experimental, s-a constatat că prezența unei faze lichide organice în lichidul de fermentație poate genera creșteri ale vitezei de transfer de masă al oxigenului, fără să fie necesară o intensificare a aerării sau o intensificare a vitezei de amestecare [Rols *et al.*, 1990, Dumont *et al.*, 2006].

Astfel, apare noțiunea de oxigen-vectori pentru acei compuși care, adăugați în lichidul de fermentație, conduc la intensificarea procesului de transfer de masă al oxigenului. Comparativ cu apa, solubilitatea oxigenului în acești compuși este de câteva zeci de ori mai mare [Galaction *et al.*, 2005].

Într-un sistem de biosinteză, oxigen-vectorii sunt lichide auxiliare, nemiscibili în faza apoasă, care îmbunătățesc transferul de masă al oxigenului [Zhaoxian *et al.*, 2014].

Oxigen-vectorii nu sunt toxici pentru biomasă și pot fi utilizați, de asemenea, în anumite situații ca sursă suplimentară de carbon și energie, precum și ca agenți antispumanti [Galaction *et al.*, 2005].

Principalii oxigen-vectori utilizați în biotehnologie sunt hidrocarburile parafinice, [Da Silva *et al.*, 2008], hidrocarburile perflorurate [Yamane *et al.*, 1974] și uleiurile: sintetice – uleiul de silicon [Leung *et al.*, 1997] și uleiurile vegetale – uleiul de palmier, uleiul de ricin, uleiul de măsline, uleiul de soia, uleiul de floarea-soarelui. Dintre aceștia, n-dodecanul, n-hexadecanul, perfluorocarburile (forane F66E) și uleiul de silicon sunt lichidele organice utilizate ca oxigen-vectori, cele mai întrebuițate în industria biotehnologică.

Deoarece consumul oxigenului de către celulele microorganismelor slab hidrofobe poate surveni numai în faza apoasă, transferul de masă al oxigenului poate avea loc doar urmând calea: bule de gaz-oxigen-vector-lichid de fermentație-biomasă [Rols *et al.*, 1990]. Astfel, mecanismul larg acceptat de acțiune al oxigen-vectorilor asupra transferului oxigenului prin toate fazele existente în interiorul bioreactorului derivă din caracteristicile chimice ale acestor compuși și presupune adsorbția picăturilor de oxigen-vector pe suprafața bulelor de aer cu sau fără formarea unui film continuu de lichid. Oxigenul difuzează, în acest mod, din bula de aer către microorganisme, prin intermediul picăturii de oxigen-vector, apoi prin faza apoasă spre biomasă. Se poate afirma faptul că, prin utilizarea oxigen-vectorilor în cadrul proceselor de fermentație, se creează în interiorul bioreactorului un sistem tetrafazic (gaz-lichid-lichid-solid), prin intermediul căruia oxigenul poate fi transferat cu un randament sporit.

Transferul oxigenului poate avea loc pe cinci căi diferite (figura 2), ca urmare a apariției unor suprafețe nou create, rezistența la transferul de masă al oxigenului, în acest caz, fiind localizată în filmul de fază apoasă de la interfața oxigen-vector-lichid de fermentație.

De asemenea, eficacitatea oxigen-vectorilor în transferul oxigenului depinde de caracteristicile lichidului de fermentație și ale biomasei, de viteza de rotație, precum și de viteza superficială a aerului.

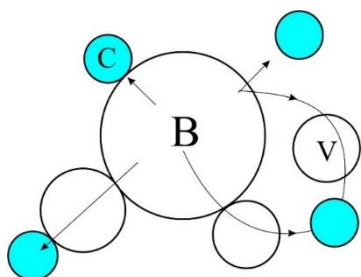


Figura 2. Mecanisme posibile de transfer de aer către celule, în prezența oxigen-vectorilor: **B**-bula de aer, **V**-oxigen-vector, **C**-celula microbiană (imagine prelucrată) [Oniscu *et al.*, 2002].

În figura 3 este redat profilul concentrației oxigenului în lichidul de biosinteză în acord cu cel mai plauzibil mecanism de preluare al oxigenului din bula de aer și transferul acestuia spre celulă prin intermediul oxigen-vectorilor.

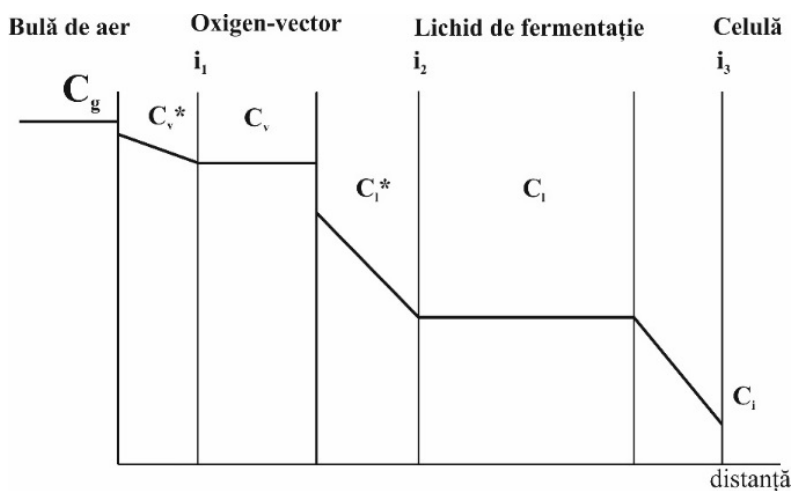


Figura 3. Profilul concentrației oxigenului în lichidul de fermentație (i_1 – interfața aer-oxigen-vector, i_2 – interfața oxigen-vector-lichid de fermentație, i_3 – interfața lichid de fermentație – biomasă) (imagine prelucrată) [Oniscu *et al.*, 2002].

Experimental, s-a constatat că rezistența la transferul de masă al oxigenului este localizată în filmul de fază apoasă de la interfața oxigen-vector - lichid de fermentație. Pe de altă parte, această rezistență este compensată de o arie interfacială mărită, iar fluxul global al oxigenului poate fi descris de următoarea ecuație:

$$n_{O_2} = k_L a \cdot (C_1^* - C_1) \quad (1)$$

în care:

$k_L a$ – coeficient volumic de transfer de masă al oxigenului în lichidul de fermentație

C_1 – concentrația oxigenului dizolvat în lichidul de fermentație

C_1^* – concentrația de echilibru al oxigenului dizolvat în lichidul de fermentație

În același timp, pentru îmbunătățirea transferului oxigenului din aer către biomasă trebuie considerată și etapa de difuzie prin membrana celulară. Astfel, variația cantității de oxigen transferată prin membrana celulară este descrisă de următoarea ecuație:

$$\frac{dQ}{d\tau} = K_c \cdot (C_1 - C_c) \cdot S \quad (2)$$

unde:

Q – cantitatea de oxigen transferată prin membrana celulară

K_c – coeficientul global de transfer de masă al oxigenului în celulă

C_1 – concentrația oxigenului în lichidul de fermentație

C_c – concentrația oxigenului în celulă

S – suprafața de transfer lichid – solid

τ – timp

Asigurarea unei cantități suficiente de oxigen se realizează, pe lângă utilizarea oxigen-vectorilor, și printr-o amestecare continuă pentru ca oxigenul adăugat prin barbotare să fie distribuit uniform în toată masa lichidului de fermentație.

I.3. Sisteme tetrafazice de fermentație

Pornind de la datele anunțate în subcapitolul anterior, numeroși cercetători semnalează efectul pozitiv al adăugării în lichidul de fermentație al acestor compuși, cu efecte directe asupra transferului de masă al oxigenului și, implicit, asupra biosintezelor. Solubilitatea crescută a oxigenului în hidrocarburi poate conduce la creșterea vitezei de transfer al oxigenului în dispersiile hidrocarbură-lichid de fermentație.

I.4. Modele matematice pentru predicția k_{LA}

Deși strategia de utilizare a hidrocarburilor drept oxigen-vectori are o largă aplicabilitate, cu efecte remarcabile și dovedite acolo unde au fost utilizate, acest lucru nu exclude totuși existența unor limite a acestor componente adăugate lichidului de fermentație.

În cazul sistemelor apoase cu adaos de oxigen-vectori, valorile k_{LA} sunt dificil de prezis, depinzând de mai mulți factori precum tipul bioreactorului, proprietățile fizico-chimice ale dispersiilor (concentrația și structura hidrocarburi), turbulența fluidelor și fracția volumică a oxigen-vectorului. Studiile au demonstrat că acest din urmă parametru are un impact semnificativ asupra valorilor k_{LA} [Galaction *et al.*, 2004].

Având în vedere importanța unui transfer optim al oxigenului în vederea optimizării performanțelor proceselor de biosinteză, a fost necesară realizarea unor modele predictive care să ofere estimări cât mai precise ale coeficienților de transfer de masă al oxigenului în lichidele de fermentație ce conțin adaosuri de hidrocarburi.

Comportamentul coeficientului k_{LA} în aceste sisteme de dispersie, comparativ cu un sistem apos, depinde și de turbulența generată de viteza de rotație și cea de aerare precum și de proprietățile de curgere ale fazei apoase și geometria specifică fiecărui bioreactor. Date fiind variabilele enunțate anterior, literatura de specialitate menționează aceste predicții ale k_{LA} în dispersiile lichid-hidrocarburi aproape numai sub forma ecuațiilor matematice (tabel 2).

Tabelul 2. Ecuații matematice pentru predicția k_{LA} conform [Wang *et al.*, 2006].

Sistemul	Fazele lichide	Ecuația (Ec.6-8, 14-18)
Bioreactor cu amestecare mecanică; $N=240-570$; $V_s=0,2-0,8$ cm/s	Soluție apoasă cu adaos de n-C ₁₀₋₂₁	$(k_{LA})_{GW} = (1,75 \cdot 10^{-2} \cdot e^{0,115 \cdot \Phi} - 0,8 \cdot 10^{-3} \cdot e^{-46,9 \cdot \Phi}) \cdot NV_s^{\frac{1}{3}}$ Ec.14
Bioreactor cu amestecare mecanică; $N=240-570$; $V_s=0,2-0,8$ cm/s	Soluție apoasă cu adaos de n-C ₁₀₋₂₁	$(k_{LA})_{OW} = \frac{1}{1+H} \cdot \frac{1}{w_o \left(\frac{1}{\Phi-1} \right)} \cdot (k_{LA})_{GW}$ Ec.15
Bioreactor cu amestecare mecanică;	Soluție xantan/ulei vegetal	$(k_{LA})_{GO} H \propto \left(\frac{P}{V} \right)^{0,36} \cdot V_s^{0,59} \cdot \Phi_W \cdot Xn^{-0,26}$

două turbine cu 6 lame; $D_t=17,6$ cm; $V_L=4L$; $N=600$ rpm; $Q=0,5$ vvm			Ec.16
Bioreactor cu amestecare mecanică; 2 turbine Rushton cu 6 lame; 4 șicane; $D_t=11$ cm, $V=1L$; $N=200-800$ rpm; $Q=0,5-2$ vm	n-hexadecan/mediu nutritiv	$k_{La} = 650 \cdot \left(\frac{P}{V}\right)^{0,31} \cdot V_s^{0,7} \cdot (1 - \phi)^{1,7}$	Ec.17
Bioreactor cu amestecare mecanică; 2 turbine cu 4 lame; 3 șicane; $D_t=17,5$ cm; $V=4$ litri; $N=0-700$ rpm; $V_s=0-0,5$ cm/s	n-dodecan/lichid de fermentație simulat (carboximetilceluloză sodică)	$k_{La} = 5,6 \cdot 10^{-3} \cdot \left[\frac{\left(\frac{P}{V}\right)^{1,54} \cdot V_s^{2,30}}{\mu_a^{3,78}} \right]^\phi$	Ec.6
Bioreactor cu amestecare mecanică; 2 turbine cu 4 lame; 3 șicane; $D_t=17,5$ cm; $V=4$ litri; $N=0-700$ rpm; $V_s=0-0,5$ cm/s	n-dodecan/ lichid de fermentație cu suspensii de <i>Propionibacterium shermanii</i>	$k_{La} = 0,714 \cdot \left[\frac{V_s^{0,97}}{\left(\frac{P}{V}\right)^{0,40} \cdot C_x^{1,22}} \right]^\phi$	Ec.7
Bioreactor cu amestecare mecanică; 2 turbine cu 4 lame; 3 șicane; $D_t=17,5$ cm; $V=4$ litri; $N=0-700$ rpm; $V_s=0-0,5$ cm/s	n-dodecan/ lichid de fermentație cu suspensii de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$k_{La} = 6,72 \cdot 10^{-2} \cdot \left[\frac{\left(\frac{P}{V}\right)^{2,74} \cdot V_s^{0,75}}{C_x^{0,03}} \right]^\phi$	Ec.8
$N = 325-1200$ rpm	CO_2 și propenă în toluen/apă; acetilenă în sulf/apă	$\frac{(k_{La})_\phi}{(k_{La})_{\phi=0}} = \left[\frac{(D_L)_\phi}{(D_L)_{\phi=0}} \right]^{\frac{1}{2}} \cdot \left[\frac{(\mu L)_{\phi=0} \cdot (\rho L)_\phi \cdot (\epsilon)_\phi}{(\mu L)_\phi \cdot (\rho L)_{\phi=0} \cdot (\epsilon)_{\phi=0}} \right]^{\frac{1}{4}}$	Ec.18

În lichidele de fermentație cu adaos de oxigen-vector, hidrocarburile au un impact semnificativ asupra coeficientului de transfer de masă al oxigenului, însă diferit în funcție de tipul și concentrația acestora, precum și în funcție de condițiile procesului și de constrângerile legate de geometria bioreactoarelor luate în considerare.

I.5. Concluzii

Deși prezența în lichidul de fermentație a celei de-a patra faze are un efect benefic asupra biosintezei, există totuși limitări în acest sens, impuse de geometria specifică al bioreactorului utilizat, precum și de efectul cumulat ai altor parametrii specifici unui proces de biosinteză.

Eficiența acestor oxigen-vectori rezultă din mecanismul specific de acțiune atunci când sunt adăugați într-un sistem de fermentație. În momentul de față, în opinia a numeroși cercetători, cel mai plauzibil mecanism de acțiune al oxigen-vectorilor este adsorbția picăturilor de hidrocarbură pe suprafața bulelor de aer, iar transferul oxigenului se desfășoară fie dinspre faza gazoasă spre cea lichidă prin intermediul picăturilor de hidrocarbură, fie direct către microorganismul existent în lichidul de fermentație, sau indirect prin faza apoasă.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

CAPITOLUL II

Obiective principale

Teza de doctorat abordează o temă de actualitate în domeniul ingineriei chimice și a biotehnologiei, și anume studiul unor procese de fermentație reale, cu diferite microorganisme în prezența n-dodecanului utilizat drept oxigen-vector, în vederea îmbunătățirii transferului de masă al oxigenului.

Experimentele efectuate pentru elaborarea tezei de doctorat au vizat următoarele direcții:

- studiul distribuției vitezei de transfer al oxigenului în lichidul de fermentație cu dispersii de oxigen-vector, pentru un bioreactor cu amestecare mecanică și diferite lichide de fermentație fără biomasă (lichide de fermentație simulate) și lichide de fermentație reale, cu microorganisme (bacterii, *Propionibacterium shermanii*, și levuri, *Saccharomyces cerevisiae*);
- realizarea unor sisteme de fermentație tetrafazice și analiza comparativă a influenței n-dodecanului utilizat drept oxigen-vector asupra posibilelor influențe pozitive în biosinteza ergosterolului în sisteme de fermentație discontinue și în sisteme de fermentație semicontinue cu *Saccharomyces cerevisiae*;
- studiul obținerii acidului fumaric prin fermentație aerobă cu *Rhizopus oryzae*, utilizând ca substrat glucoza și stabilirea influenței oxigen-vectorului, n-dodecan asupra transferului de masă al oxigenului și asupra posibilelor influențe pozitive în biosinteza acidului fumaric, precum și analiza influenței morfologiei de pelet a fungilor asupra acestor procese;
- studiul îmbunătățirii biosintezei și a activității β -galactozidazei în fermentațiile aerobe cu *Escherichia coli* în prezența oxigen-vectorului, prin analiza comparativă a influenței n-dodecanului asupra întregului proces de biosinteză în funcție de concentrația în care se utilizează, precum și modalitatea prin care oxigen-vectorul, în diferite concentrații influențează viteza specifică de creștere a microorganismului, de utilizare a substratului și de sinteză a proteinelor.

CAPITOLUL III

Tehnica experimentală

III.1. Echipamente

Studiile experimentale realizate în cadrul tezei de doctorat au fost efectuate cu ajutorul unor echipamente de laborator adecvate, iar tehnicile de lucru și de prelucrare a datelor obținute au coincis obiectivelor propuse.

Echipamentele experimentale utilizate au asigurat obținerea unor rezultate reproductibile și au susținut valoarea științifică a acestora.

Experimentele s-au realizat cu ajutorul următoarelor echipamente:

1. Bioreactorul cu amestecare mecanică *Biostat B Braun Biotech International*
(figura 4)



Figura 4. Bioreactorul cu amestecare mecanică *Biostat B Braun Biotech International* (foto original).



Figura 6. Bioreactorul cu amestecare mecanică *Fermac 360, Electrolab* (foto original).

- 2. Bioreactorul cu amestecare mecanică *Fermac 360, Electrolab*** (figura 6)
- 3. Autoclav *Trade Raypa Steam Sterilizer***
- 4. Incubatorul *GFL***
- 5. Baie de apă *Cole-Parmer***
- 6. Centrifuga *BK-H3021J***
- 7. Sonicator *UP200S Hielscher Ultrasound Technology***
- 8. Vîscozimetrul rotativ *Haake Viscometer 6 Plus type***

Pentru etapa de analiză cantitativă și calitativă a datelor experimentale obținute, în care s-a urmărit dozarea concentrației compușilor rezultați în urma proceselor de fermentație (vitamine, acizi, enzime), s-au utilizat următoarele echipamente:

- 9. Analizorul *Labo Trace* pentru dozarea glucozei**
- 10. Spectrofotometrul *UV-Vis CAMSPEC M550 UV***
- 11. Analizorul *Funker Garber***
- 12. HPLC *Dionex Ultimate 3000* prevăzut cu detector *UN-VIS* și *IR***
- 13. Microscopul *OPTIKA B-500 DK* Cameră *Aiptek HD 1080P***

III.2. Microorganisme și reactivi

III.2.1. Microorganisme

- 1. *Propionibacterium shermanii***
- 2. *Saccharomyces cerevisiae***
- 3. *Rhizopus oryzae*, tulpina ATCC 20344**
- 4. *Escherichia coli*, tulpina ATCC 15224**

III.2.2. Reactivi

1. Inoculul

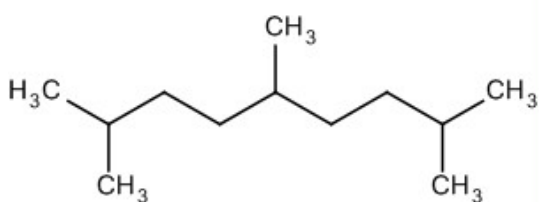
Pentru realizarea tuturor experimentelor au fost realizate culturi stoc după care s-au preparat culturi inocul. Transferul culturii inocul în bioreactor se realizează în condiții aseptice, după o perioadă de dezvoltare bine stabilită. Începutul fazei de biosinteză este considerat momentul transferului culturii inocul în mediul de cultură sterilizat și răcit la temperatura de cultivare a microorganismului utilizat în procesul respectiv.

2. Mediul de cultură

În cadrul proceselor biotehnologice, mediile de cultură reprezintă suporturi nutritive care permit creșterea, dezvoltarea și studiul comportamentului unui microorganism în afara nișei ecologice naturale. Compoziția mediilor de cultură prezintă o mare importanță asupra eficienței unui proces biotehnologic.

Un mediu de cultură utilizat pentru dezvoltarea microorganismelor trebuie să conțină obligatoriu sursa de carbon, reprezentată, în general, de glucide (glucoza, amidonul, lactoza, zaharoza), sursa de azot, care poate fi organică (aminoacizi, proteine, uree) sau anorganică [NH_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], sursa de fosfor, oligoelemente (K, Mg, Fe) și factori de creștere.

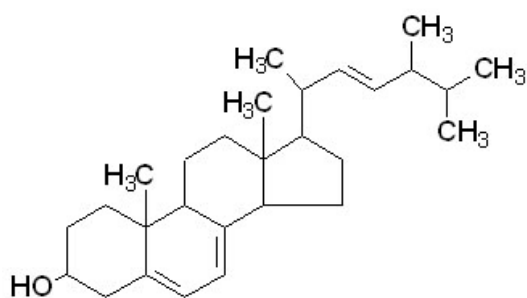
3. Oxigen-vectorul: n-Dodecanul (SIGMA Chemie GmbH)



n-Dodecanul este un alcan superior cu 12 atomi de carbon, cu aspect uleios și care prezintă numeroși izomeri de structură (figura 23).

Figura 23. Structura chimică a n-dodecanului.

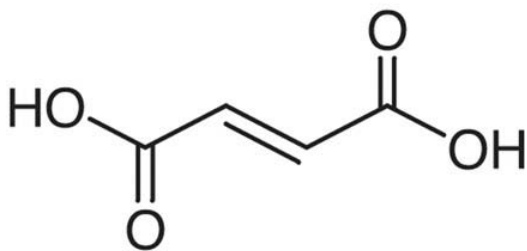
4. Ergosterolul (ergost-5,7,22-trien-3 β) sau provitamina D₂ este un compus lipidic de natură



sterolică întâlnit în membrana celulară la fungi și protozoare, având diverse funcții asemănătoare cu cele ale colesterolului din celulele animale. În celulele de drojdii, ergosterolul se găsește în interiorul membranelor celulare, sub formă liberă sau ca esterii ai nucleului sterolic cu diferiți acizi grași (figura 24), [Veen *et al.*, 2003].

Figura 24. Structura chimică a moleculei de ergosterol.

5. Acidul fumaric (acidul trans-butendioic) este un compus cu patru atomi de carbon, făcând parte, alături de acidul maleic, din categoria acizilor dicarboxilici nesaturați. Acidul fumaric se găsește



în mod natural în anumite specii de ciuperci, licheni și plante. A fost pentru prima dată izolat din *Fumaria officinalis* [Roa Engel *et al.*, 2008] (figura 25).

Figura 25. Structura chimică a moleculei acidului fumaric.

6. β -galactozidaza (lactaza sau 4-O[β -D-galactopiranozil]-D-gluco-piranoză) este o enzimă responsabilă de hidroliza lactozei, precum și a tuturor compușilor β -glicozidici. β -galactozidaza este un tetramer format din patru lanțuri polipeptidice identice, fiecare conținând câte 1023 aminoacizi.

III.3. Metode de măsurare și analiză

1. Metoda statică face parte din categoria metodelor biologice de determinare a concentrației oxigenului solvit sau a coeficienților de transfer de masă al oxigenului, în condițiile în care acest element constituie substratul limitativ [Cașcaval *et al.*, 2006, Van't Riet, 1991].

2. Metoda dinamică face parte de asemenea din categoria metodelor biologice de determinare a coeficienților de transfer de masă al oxigenului și se aplică lichidelor de fermentație care conțin biomasă. Comparativ cu metoda statică de determinare al oxigenului dizolvat în lichidul de fermentație, metoda dinamică presupune pe lângă influența constituenților mediilor de cultură asupra vitezei de transfer al oxigenului și influența modificărilor caracteristicilor reologice ale lichidului de fermentație odată cu evoluția biosintezei.

3. Metoda de dozare cromatografică de înaltă performanță în stare lichidă (HPLC) a fost utilizată pentru cuantificarea tuturor compușilor rezultați în urma proceselor de biosinteză. Pentru aplicarea acestei metode de cuantificare s-a folosit un sistem Dionex echipat cu detector de tip UV și tip IR și două tipuri de coloane. O coloană pentru carbohidrați HyperRez Ca^{2+} (300·7,7 mm, 8 μm) și o coloană pentru acizi organici, Acclaim OA (150·4,5 mm, 5 μm). În cazul primei coloane faza mobilă a fost apa ultrapură, alimentată cu un debit de 0,6 ml/min, la o temperatură a coloanei de 80°C, detecția realizându-se în domeniul IR.

A doua coloană a funcționat utilizând ca fază mobilă o soluție de sulfat de sodiu 40 mM, la o temperatură a coloanei de 30°C, detecția realizându-se la 210 nm. Pentru cuantificarea ergosterolului s-a utilizat o coloană de tip LiChrospher Si 100 (250·4,6 mm, 5 μm). Această coloană a funcționat utilizând ca fază mobilă un amestec de n-hexan și tetrahidrofuran într-un raport de 85:15, cu un debit de 1 ml/min, detecția realizându-se la 280 nm.

4. Metoda de dozare spectrofotometrică a fost utilizată pentru cuantificarea unor compuși rezultați în urma proceselor de biosinteză, precum și la măsurarea cantității de biomasă în timpul fermentațiilor. Lungimile de undă de detecție utilizate au fost:

- în spectrul UV la 280 nm pentru cuantificarea ergosterolului;

- în spectrul vizibil:

- 595 nm pentru cuantificarea concentrației proteinelor totale biosintetizate de *Escherichia coli* și
- 660 nm pentru cuantificarea biomasei de *Saccharomyces cerevisiae* și *Escherichia coli*.

CAPITOLUL IV

Studiul distribuției vitezei transferului de masă al oxigenului în diferite lichide de fermentație în prezența n-dodecanului cu rol de oxigen-vector

Sistemul de fermentație tetrafazic este un sistem polifazic constituit din: faza gazoasă, reprezentată de aer (oxigen, dioxid de carbon, alte gaze), două faze lichide (lichidul de fermentație și oxigen-vectorul reprezentat de n-dodecan) și cea de-a patra fază, faza solidă reprezentată de biomasă.

Deși literatura de specialitate oferă multiple corelații pentru determinarea valorii k_{La} , există încă numeroase întrebări cu privire la exactitatea predicției acestui parametru din cauza puternicei influențe pe care o exercită geometria bioreactorului și a limitelor restrânse ale domeniului de operare pentru care modelele matematice propuse sunt adecvate, precum și din cauza metodelor experimentale utilizate pentru determinarea acestui parametru.

Mai mult decât atât, aplicabilitatea acestor relații este limitată la câteva specii de microorganisme, iar aceste relații cuantifică viteza de transfer de masă al oxigenului pentru o anumită regiune din bioreactor, fără a se indica însă și distribuția vitezei de transfer al oxigenului în întreg volumul lichidului de fermentație. Aceste limitări devin și mai puternice în cazul sistemelor de fermentație aerobe care conțin oxigen-vectori.

Din aceste motive, unul dintre **obiectivele** acestei teze este **analiza distribuției vitezei de transfer al oxigenului** în lichidul de fermentație în care este dispersat un oxigen-vector, pentru un bioreactor cu amestecare mecanică și diferite lichide fără biomasă (lichide de fermentație simulate) și lichide de fermentație reale, care conțin culturi de microorganisme (bacterii – *Propionibacterium shermanii* și levuri – *Saccharomyces cerevisiae*).

Experimentele au fost efectuate în bioreactorul de laborator de 5 litri (4 litri volum util), Biostat A, B Braun Biotech International), cu sistem computerizat de monitorizare și control a parametrilor, în care s-au utilizat lichide de fermentație simulate și reale.

Turația a fost menținută sub 600 rpm, iar debitul volumic al aerului a variat de la 75 l/h la 450 l/h, corespunzător unei viteze superficiale a aerului de $8,4 \cdot 10^{-4}$ m/s.

Lichidele de fermentație simulate au fost realizate dintr-o soluție de carboximetilceluloză sodică cu o comportare pseudoplastică și o vâscozitate aparentă cuprinsă între 10-96 cP. Lichidele de fermentație reale au fost realizate prin intermediul culturilor a două tipuri de microorganisme, după cum urmează:

- bacterii: *Propionibacterium shermanii*, $C_X = 30,5-120,5$ g/l s.u. și o vâscozitate aparentă cuprinsă între 1,8-5,7 cP și
- levuri: *Saccharomyces cerevisiae*, $C_X = 30-110$ g/l s.u. și o vâscozitate aparentă cuprinsă între 2,2-7,8 cP.

Din cauza dificultății măsurării *in situ* a vâscozității în timpul experimentelor, aceasta a fost măsurată înainte și după fiecare experiment folosind un vâscozimetru rotativ Haake Viscometer 6 Plus type. Ambele experimente precum și măsurătorile vâscozității au fost realizate la 30°C. Pe parcursul experimentelor nu a fost înregistrată nici o schimbare a vâscozității lichidelor de fermentație sau a morfologiei microorganismelor utilizate.

Oxigen-vectorul utilizat a fost n-dodecanul, a cărui fracție volumică în lichidul de fermentație a variat între 0 și 20% vol. Pentru determinarea valorii k_{LA} s-a utilizat metoda statică. Concentrația oxigenului dizolvat în lichidul de fermentație a fost măsurată cu ajutorul unui electrod de oxigen de tipul InPro 6000 Series type (Mettler Toledo) (figura 5).

Pentru analiza distribuției vitezei de transfer al oxigenului în interiorul lichidului de fermentație, electrodul de oxigen a fost introdus în patru poziții diferite, dispuse vertical în bioreactor începând cu partea inferioară a acestuia după cum urmează:

- poziția 1: la 20 mm
- poziția 2: la 70 mm
- poziția 3: la 120 mm
- poziția 4: la 170 mm

Corelațiile matematice, care descriu influențele diferiților factori asupra k_{LA} pentru cele patru poziții din interiorul lichidului de fermentație, au fost dezvoltate utilizând softul MATLAB. Pentru datele experimentale a fost efectuată o analiză de regresie liniară multiplă, diferența dintre datele experimentale și cele modelate fiind cuantificată prin abaterea medie pătratică. Fiecare experiment a fost efectuat de trei ori, în condiții similare de lucru, luând în calcul media valorilor k_{LA} . Erorile maxime au variat între $\pm 3,72$ și $\pm 5,91\%$.

Rezultatele raportate în literatura de specialitate au indicat faptul că adăugarea de hidrocarburi în lichidul de fermentație poate crește concentrația oxigenului dizolvat.

Efectul adăugării oxigen-vectorilor asupra transferului oxigenului trebuie să fie analizat în strânsă legătură și cu caracteristicile lichidului de fermentație, mai ales în cazul prezenței și acumulării biomasei.

Mai mult decât atât, ca urmare a afinității diferite a celulelor microorganismelor pentru picăturile de hidrocarbură, acestea pot fi mai ușor adsorbite pe suprafața picăturilor de oxigen-vector formând cu acestea asociații, care pot fi ulterior mai ușor adsorbite pe suprafața bulelor de aer.

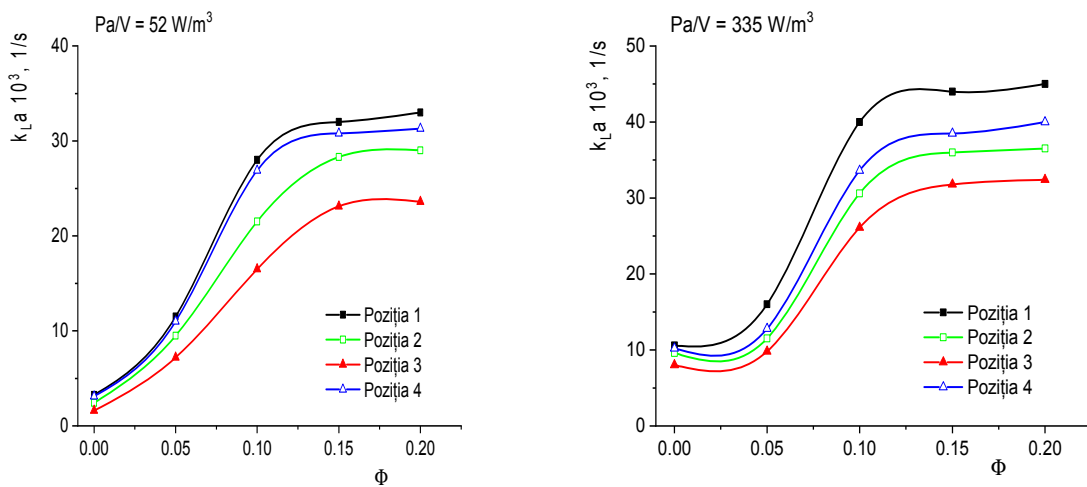
Prin urmare, prezența în lichidul de fermentație a picăturilor de n-dodecan duce la creșterea ariei interfaciale pentru transferul de masă al oxigenului.

IV.1. Lichide de fermentație simulate

Prezența n-dodecanului în lichidul de fermentație mărește considerabil concentrația oxigenului dizolvat, fapt ce compensează efectul nefavorabil al unei vâscozități ridicate asupra vitezei transferului de masă al oxigenului.

Prin urmare, fără a se lua în calcul valoarea vâscozității aparentă a lichidelor de fermentație simulate, valoarea acestui coeficient a crescut odată cu creșterea fracției volumice a oxigen-vectorului. Astfel, la o vâscozitate aparentă scăzută de 15 cP, pot fi observate două domenii de variație ale coeficientului de transfer de masă al oxigenului (figura 26).

$$\eta_a = 15 \text{ cP}$$



$$\eta_a = 96 \text{ cP}$$

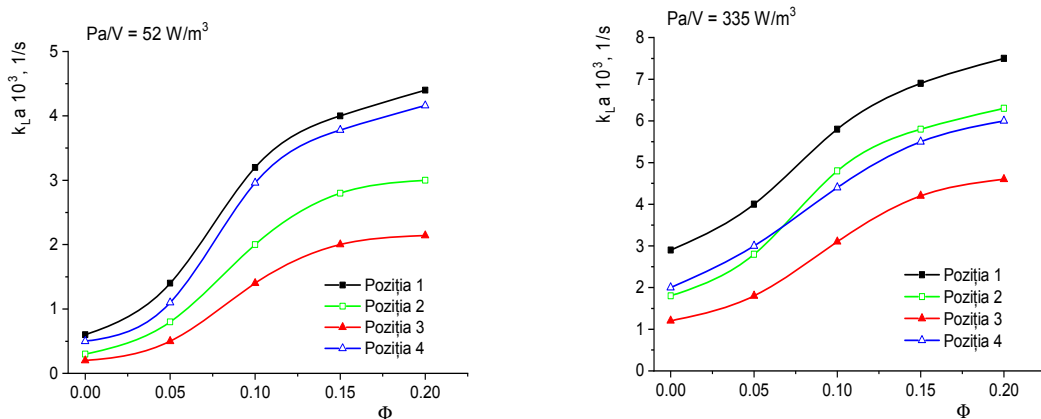


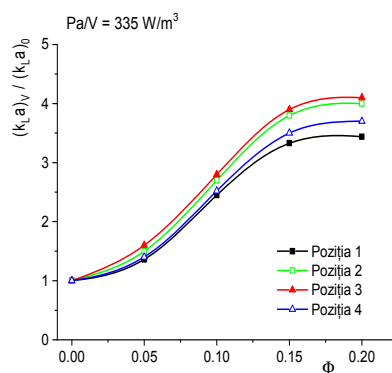
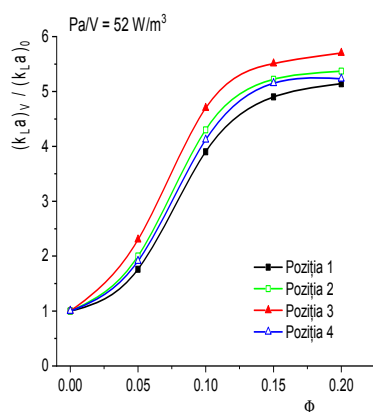
Figura 26. Influența concentrației n-dodecanului asupra coeficientului de transfer de masă al oxigenului la diferite valori ale vâscozității lichidelor de fermentație simulate și la diferite puteri specifice.

Ca efect al intensificării amestecării însă, valoarea k_{LA} devine constantă la o fracție volumică a oxigen-vectorului de 10% vol. Prin comparație, analiza în condiții experimentale similare ale unui sistem de fermentație cu adaos de oxigen-vector conduce la o creștere de câteva ori a vitezei de transfer de masă al oxigenului. Această creștere a valorii transferului de masă a fost descrisă prin intermediul factorului de amplificare.

Factorul de amplificare este o mărime care descrie creșterea valorii transferului de masă al oxigenului. Această mărime a fost definită ca raportul dintre valoarea k_{LA} în prezența oxigen-vectorului, $(k_{LA})_V$, și cea în absența acestuia, $(k_{LA})_0$, în aceleași condiții experimentale.

În figura 27 se poate observa faptul că efectul pozitiv al adăugării n-dodecanului depinde de vâscozitatea lichidului de fermentație, de intensitatea amestecării, precum și de poziția electrodului de oxigen în interiorul bioreactorului. Pentru toate situațiile luate în calcul, reducerea vâscozității aparente, concomitent cu intensificarea vitezei de rotație, conduce la diminuarea efectului pozitiv al hidrocarburi asupra coeficientului transferului de masă al oxigenului.

$$\eta_a = 15 \text{ cP}$$



$$\eta_a = 96 \text{ cP}$$

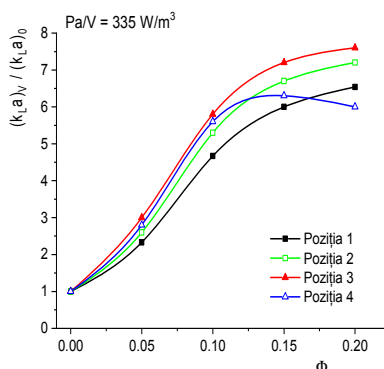
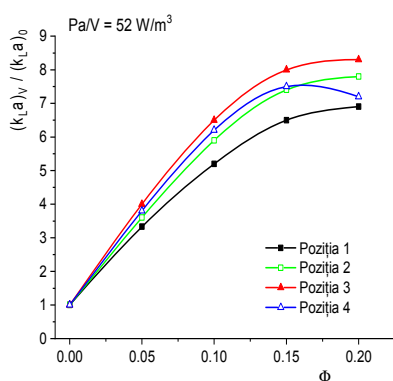
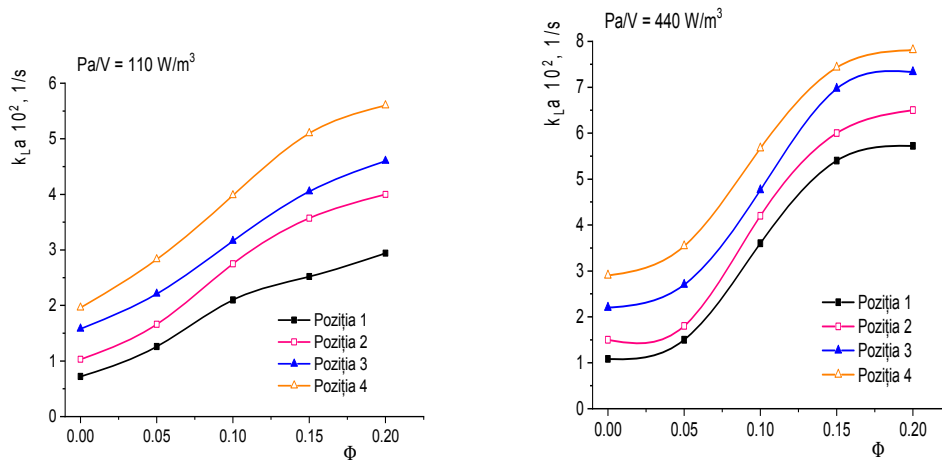


Figura 27. Influența concentrației n-dodecanului asupra factorului de amplificare la diferite valori ale vâscozității lichidelor de fermentație simulate și la diferite puteri specifice ($(k_{LA})_V$ – valoarea k_{LA} în prezența oxigen-vectorului, $(k_{LA})_0$ – valoarea k_{LA} în absența oxigen-vectorului).

IV.2. Suspensii de *Propionibacterium shermanii*

Propionibacterium shermanii este principala bacterie aerobă capabilă să producă vitamina B₁₂ la scară industrială. Deși efectele prezente ale celulelor acestei bacterii asupra caracteristicilor reologice ale lichidului de fermentație și ale vitezei de transfer al oxigenului sunt mai puțin importante prin comparație cu celelalte tipuri de microorganisme, totuși ele nu pot fi neglijate. Mai mult, afinitatea celulelor pentru picăturile de hidrocarbură reprezintă un factor important în controlul transferului de masă al oxigenului în sistemele de fermentație care conțin oxigen-vectori.

$$C_X = 30,5 \text{ g/l s.u.}$$



$$C_X = 120,5 \text{ g/l s.u.}$$

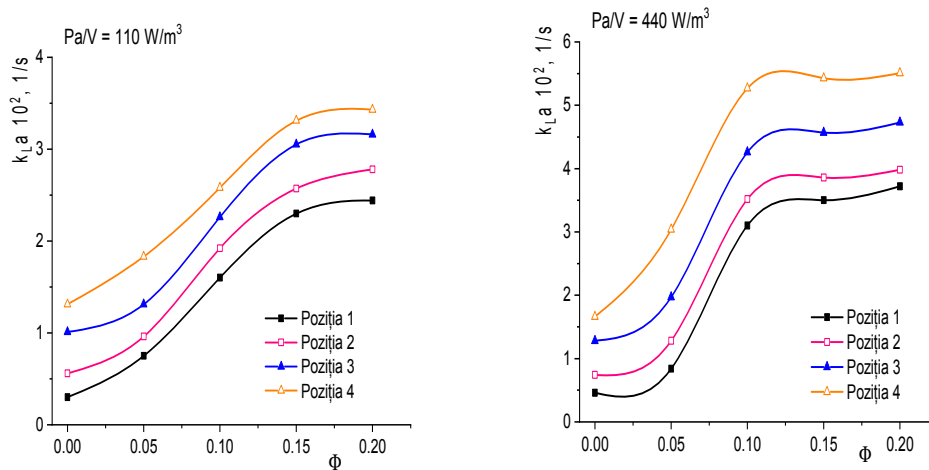


Figura 29. Influența concentrației n-dodecanului asupra coeficientului de transfer de masă al oxigenului la diferite concentrații ale biomasei și la diferite puteri specifice (C_X – concentrația biomasei, s.u. – substanță uscată).

Din figura 29 se poate observa, pentru toate pozițiile sensorului, că viteza de transfer al oxigenului se intensifică odată cu creșterea concentrației n-dodecanului și cu cea a puterii specifice. Totuși, alura graficelor care reprezintă dependența dintre coeficientul de transfer de masă al oxigenului și fracția volumică al oxigen-vectorului se modifică odată cu creșterea concentrației biomasei și a intensității amestecării.

Prin urmare, indiferent de poziția din interiorul bioreactorului, la intensități mai mari ale amestecării și pentru fracții volumice ale n-dodecanului mai mari de 15% vol., valoarea coeficientului transferului de masă al oxigenului rămâne la un nivel constant.

Spre deosebire de lichidele de fermentație simulate, în lichidele de fermentație reale efectul favorabil al adaosului oxigen-vectorului este diminuat ca urmare a adsorbției celulelor bacteriene pe suprafața picăturilor de oxigen-vector.

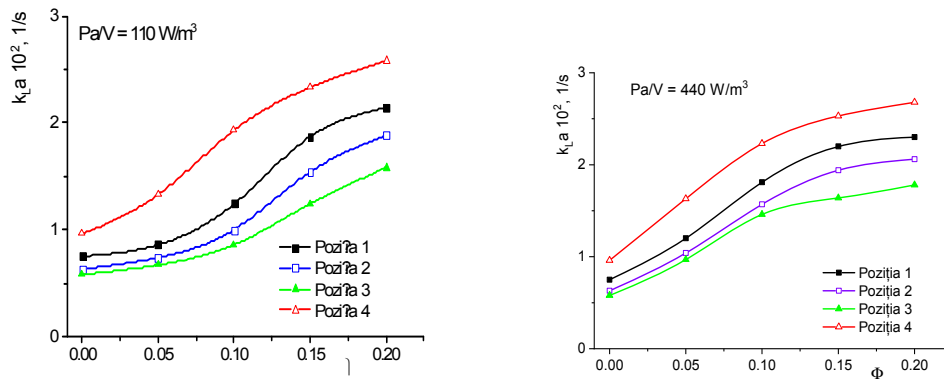
Odată cu intensificarea puterii specifice, la concentrații mai mari ale biomasei, fenomenul de desorbție devine mai pronunțat. Din acest motiv, odată cu intensificarea amestecării, valoarea concentrației biomasei de *Propionibacterium shermanii* pentru care se obține un minim al raportului $(k_{LA})_v/(k_{LA})_0$ este redusă. Mai mult, pe întreaga înălțime a lichidului de fermentație concentrația biomasei este distribuită neuniform ca rezultat al depunerii celulelor la partea inferioară a bioreactorului. Intensitatea amestecării este și ea neuniformă, fiind mai scăzută în pozițiile 2 și 3 comparativ cu regiunea inferioară, respectiv cea superioară. Luând în considerare toate aceste aspecte, valoarea factorului de amplificare înregistrată pentru pozițiile 2 și 3 este inferioară valorilor obținute pentru pozițiile 1 și 4.

IV.3. Suspensii de *Saccharomyces cerevisiae*

Valorile vîscozităților sistemelor de fermentație cu suspensii de celule bacteriene și ale celor cu suspensii de celule levuriene sunt apropiate. În absența n-dodecanului, pentru concentrații similare ale biomaselor celor două sisteme, valorile coeficientului de transfer de masă al oxigenului variază în funcție de parametrii constructivi ai bioreactorului și de condițiile specifice de operare. Cu toate acestea, o afinitate sporită pentru faza organică în cazul levurilor induce un comportament diferit în comparație cu cel al bacteriilor, celulele levurilor fiind adsorbite pe suprafața picăturilor de hidrocarbură pe parcursul întregului proces de fermentație. Din figura 32 se poate observa faptul că în condiții experimentale similare, în prezența n-dodecanului, valoarea vitezei de transfer de masă al oxigenului în lichidul de fermentație, care conține microorganismul *Saccharomyces cerevisiae*, este mai mică comparativ cu valoarea k_{LA} pentru lichidul de fermentație care conține celule bacteriene.

Ca rezultat al distribuției neuniforme a intensității amestecării și a concentrației biomasei pe înălțimea lichidului de fermentație, cea mai mare valoare a coeficientului de transfer de masă al oxigenului a fost înregistrată pentru pozițiile 4, respectiv 1, în timp ce valorile cele mai scăzute corespund pozițiilor intermediare 2 și 3. Variația factorului de amplificare în timpul acumulării celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* în lichidul de fermentație este complet diferită față de observațiile anterioare pentru suspensiile bacteriene.

$C_X = 30 \text{ g/l s.u.}$



$C_X = 110 \text{ g/l s.u.}$

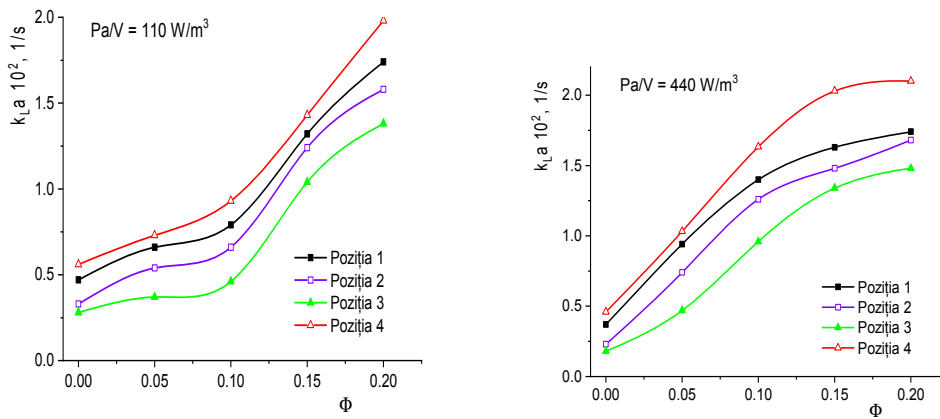


Figura 32. Influența concentrației n-dodecanului asupra coeficientului de transfer de masă al oxigenului la diferite concentrații ale biomasei celulelor de drojdie și la diferite puteri specifice.

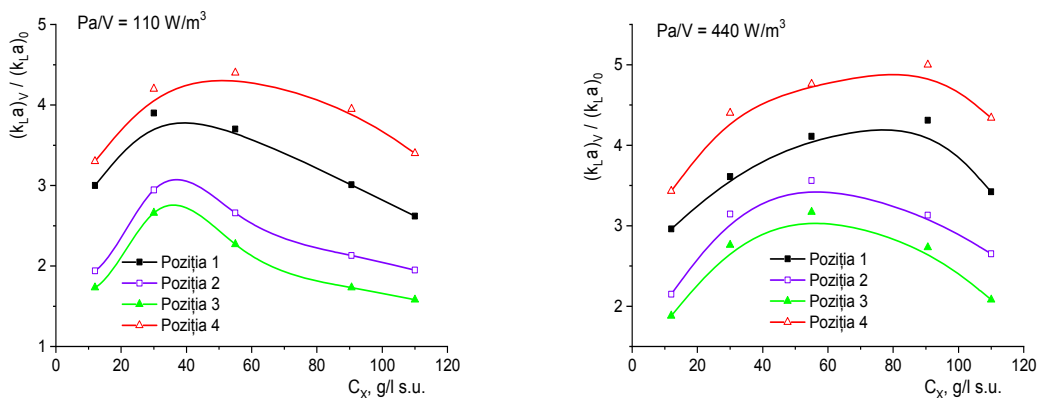


Figura 33. Influența concentrației biomasei levuriene asupra factorului de amplificare la diferite valori ale puterii specifice.

Astfel, în cazul suspensiilor de *Saccharomyces cerevisiae*, raportul $(k_{La})_v/(k_{La})_0$ atinge o valoare maximă, după care înregistrează o diminuare a valorilor (figura 33).

Deși intensitatea aerației determină efecte similare, creșterea consumului de putere conduce, de asemenea, la creșterea fracției volumice de aer în lichidul de fermentație și diminuarea gradului de acoperire ale suprafețelor bulelor de aer de către picăturile de hidrocarbură. În consecință, factorul de amplificare este redus. Din cauza acestor efecte opuse, influența vitezei de aerare asupra factorului de amplificare pentru suspensiile de *Saccharomyces cerevisiae* este diferită față de cea înregistrată pentru lichidele de fermentație simulate și pentru cele cu suspensii microbiene. În acest caz, valoarea maximă a raportului $(k_{La})_v/(k_{La})_0$ este atinsă la o viteză superficială a aerului de $3,35 \cdot 10^{-3}$ m/s și scade de la 4,4 la 2,2 odată cu acumularea biomasei de *Saccharomyces cerevisiae* de la 30 la 110 g/l s.u.

IV.4. Corelații pentru distribuția vitezei de transfer al oxigenului

Pe baza datelor experimentale realizate s-au obținut corelații matematice care descriu și stabilesc influența concentrației oxigen-vectorului, a vîscozității aparente, a concentrației biomasei, a puterii specifice și a vitezei superficiale a aerului asupra coeficientului de transfer de masă al oxigenului pentru cele patru poziții alese arbitrar din interiorul lichidului de fermentație. În funcție de sistemul studiat, au fost considerate două ecuații generale:

a. pentru lichidele de fermentație simulate (ecuația 20):

$$k_{La} = \alpha \cdot \eta_a^\beta \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^\gamma \cdot v_s^\sigma \quad (20)$$

b. pentru lichidele de fermentație reale cu suspensii de *Propionibacterium shermanii* și *Saccharomyces cerevisiae* (ecuația 21):

$$k_{La} = \alpha \cdot C_X^\beta \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^\gamma \cdot v_s^\sigma \quad (21)$$

unde:

k_{La} - coeficientul de transfer de masă al oxigenului, 1/s

η_a - vîscozitatea aparentă, $P_a \cdot s$

P_a/V - puterea specifică, W/m^3

v_s - viteza superficială a aerului, m/s

C_X - concentrația biomasei, g/l s.u.

Φ - fracția volumică a oxigen-vectorului

$\alpha, \beta, \gamma, \delta$ - parametrii ecuațiilor

Valorile coeficienților β, γ și δ au valori dependente de concentrația n-dodecanului. Aceștia au fost calculați prin metoda multiregresiei utilizând programul MATLAB. Astfel, au fost obținute următoarele corelații:

a. pentru lichidele de fermentație simulate (ecuațiile 22-25):

poziția 1

$$k_L a = 1,18 \cdot \left[\frac{\eta_a^{1,27}}{v_s^{2,12} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{3,11}} \right]^\phi, 1/s \quad (22)$$

poziția 2

$$k_L a = 1,12 \cdot \left[\frac{\eta_a^{3,63}}{v_s^{0,85} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{2,35}} \right]^\phi, 1/s \quad (23)$$

poziția 3

$$k_L a = 1,72 \cdot \left[\frac{\eta_a^{1,91}}{v_s^{0,35} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{3,10}} \right]^\phi, 1/s \quad (24)$$

poziția 4

$$k_L a = 2,17 \cdot \left[\frac{\eta_a^{2,67}}{v_s^{0,31} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{3,77}} \right]^\phi, 1/s \quad (25)$$

b. pentru lichide de fermentație reale cu suspensii de *Propionibacterium shermanii* (ecuațiile 26-29):

poziția 1

$$k_L a = 0,76 \cdot \left[\frac{C_X^{1,61}}{v_s^{0,46} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{3,33}} \right]^\phi, 1/s \quad (26)$$

poziția 2

$$k_L a = 2,38 \cdot 10^{-2} \cdot \left[\frac{C_X^{2,27}}{v_s^{0,66} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{8,19}} \right]^\phi, 1/s \quad (27)$$

poziția 3

$$k_L a = 3,81 \cdot 10^{-2} \cdot \left[\frac{C_X^{0,31} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{0,15}}{v_s^{0,66}} \right]^\phi, 1/s \quad (28)$$

poziția 4

$$k_L a = 3,74 \cdot 10^{-2} \cdot \left[\frac{C_X^{0,15} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{0,25}}{v_s^{8,72 \cdot 10^{-3}}} \right]^\phi, 1/s \quad (29)$$

c. pentru lichide de fermentație reale cu suspensii de *Saccharomyces cerevisiae* (ecuațiile 30-33):

poziția 1

$$k_L a = 8,91 \cdot 10^{-2} \cdot \left[\frac{C_X^{8,46 \cdot 10^{-2}}}{v_S^{0,39} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{0,17}} \right]^\phi, 1/s \quad (30)$$

poziția 2

$$k_L a = 7,10 \cdot 10^{-2} \cdot \left[\frac{C_X^{1,95}}{v_S^{0,74} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{3,81}} \right]^\phi, 1/s \quad (31)$$

poziția 3

$$k_L a = 6,12 \cdot 10^{-3} \cdot \left[\frac{C_X^{0,81} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{0,11}}{v_S^{1,60 \cdot 10^{-2}}} \right]^\phi, 1/s \quad (32)$$

poziția 4

$$k_L a = 9,16 \cdot 10^{-3} \cdot \left[\frac{C_X^{0,33} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{0,327}}{v_S^{6,26 \cdot 10^{-2}}} \right]^\phi, 1/s \quad (33)$$

Ecuatiile propuse oferă o bună corelație cu datele experimentale, abaterea medie fiind de $\pm 6,92\%$ pentru lichidele de fermentație simulate, de $\pm 8,40\%$ pentru lichidul de fermentație cu suspensii de *Propionibacterium shermanii* și de $\pm 9,73\%$ pentru cel cu suspensii de *Saccharomyces cerevisiae*.

IV.5. Concluzii

Adăugarea oxigen-vectorului respectiv a n-dodecanului, în lichidul de fermentație determină o creștere de câteva ori a vitezei de transfer de masă al oxigenului comparativ cu sistemele de fermentație aerobe convenționale, fără a mai fi necesară o amestecare suplimentară sau o intensificare a aerației.

Însă influența oxigen-vectorului asupra valorii coeficientului volumic de transfer de masă al oxigenului și al distribuției vitezei de transfer în interiorul lichidului de biosinteză trebuie să fie analizată în corelație cu caracteristicile lichidului (vîscozitatea aparentă și concentrația biomasei), parametrii de operare ai bioreactorului și, cel mai important, afinitatea celulelor microorganismelor pentru picăturile de hidrocarbură.

Amplitudinea influenței factorilor considerați diferă în interiorul lichidului de fermentație de la o regiune la alta. Efectul pozitiv al adaosului de n-dodecan a fost înregistrat pentru toate cele patru poziții din interiorul bioreactorului, fiind mai important pentru lichidele de fermentație simulate și pentru lichidele de fermentație reale cu suspensii de *Propionibacterium shermanii*, ca urmare a absenței sau a slabei afinități ale celulelor pentru picăturile de hidrocarbură.

Deși valorile obținute ale variațiilor, care redau dependența dintre viteza de transfer de masă al oxigenului și puterea specifică, sunt foarte apropiate pentru cele trei sisteme studiate, influența intensificării amestecării depinde și de tipul lichidului de fermentație

În fermentațiile reale cu suspensii bacteriene, indiferent de poziția din interiorul bioreactorului, coeficientul de transfer de masă al oxigenului crește odată cu intensificarea amestecării, atinge o valoare maximă, apoi descrește. Această variație este mai pronunțată în cazul suspensiilor celulare mai puțin concentrate.

În toate cazurile studiate, influența vitezei superficiale a aerului a fost similară cu cea a influenței intensității amestecării asupra factorului de amplificare.

CAPITOLUL V

Studiul influenței n-dodecanului asupra eficienței biosintezei ergosterolului

Studiile asupra transferului de masă al oxigenului în lichidele de fermentație care conțin suspensii de *Saccharomyces cerevisiae*, prezentate în capitolul anterior, au indicat faptul că prezența oxigen-vectorilor în lichidul de fermentație determină o îmbunătățire a coeficientului de transfer de masă al oxigenului de câteva ori, magnitudinea acestui efect depinzând de concentrația hidrocarburii, de puterea specifică și de afinitatea celulelor microbiene față de picăturile de hidrocarbură. Această îmbunătățire a coeficientului de transfer de masă al oxigenului poate conduce și la mărirea cantității de produs final biosintetizat.

Pornind de la premisa referitoare la influența pozitivă a prezenței oxigen-vectorilor în lichidele de fermentație, ca urmare a unei relații directe dintre îmbunătățirea coeficientului de transfer de masă al oxigenului și cantitatea finală de produs biosintetizat, studiile efectuate în cadrul acestui capitol al tezei de doctorat își propun investigarea potențialului efect pozitiv al adăugării oxigen-vectorilor în lichidul de fermentație în scopul îmbunătățirii biosintezei ergosterolului de către *Saccharomyces cerevisiae*. În acest sens, s-a utilizat n-dodecanul drept oxigen-vector (în diferite fracții volumice) și s-a analizat în mod comparativ sistemele de fermentație cu și fără adaos de oxigen-vector. De asemenea, sistemele care au conținut oxigen-vector au fost analizate în regim de fermentație discontinuă și în regim de fermentație semicontinuă (sisteme în care a fost adăugat periodic substrat, respectiv glucoză).

V.1. Tehnica experimentală

Mediul solid de creștere pentru culturile celulare de *Saccharomyces cerevisiae* (15 ml) a fost realizat pe plăci Petri. Pe acest mediu au fost însămânțate celulele de *Saccharomyces cerevisiae*, crescute, ulterior, în incubator la $30 \pm 1^\circ\text{C}$ timp de 20 de ore.

O colonie din această cultură a fost apoi transferată în 50 ml de mediu lichid steril, cu aceeași compoziție ca cea a mediului de cultură pentru fermentație, și incubată la 30°C și 180 rpm pentru 24 h, în vederea obținerii inoculului pentru fermentație. Pentru realizarea fermentațiilor

s-a utilizat un bioreactor de laborator cu o capacitate de lucru de 1 litru volum util, de tipul Fermac 360 produs de Electrolab UK, echipat cu sistem automat de măsură și control.

După pregătirea mediului de cultură, acesta a fost sterilizat în autoclava, la o temperatură de 121°C, timp de 30 de minute, simultan cu soluția de glucoză sterilizată separat. După sterilizare și răcire până la temperatura de fermentație, mediul a fost inoculat cu 5% vol. inocul.

Pentru sistemul de fermentație semicontinuă s-a realizat, în aceleași condiții experimentale, un mediu de cultură cu aceeași compoziție chimică; în plus, s-a realizat o soluție sterilă de glucoză cu o concentrație de 60 g/l, care a fost adăugată automat cu ajutorul unei pompe peristaltice la fiecare 30 de minute ale procesului. Fermentațiile s-au desfășurat la o temperatură de 30°C, 300 rpm și un debit de aer de 5 l/h, pe parcursul a 48 h de fermentație. Valoarea pH-ului a fost menținută în jurul valorii de 5,4 cu ajutorul unei soluții de amoniac cu o concentrație de 25%. Oxigen-vectorul utilizat a fost n-dodecanul. Hidrocarbura a fost adăugată în lichidul de fermentație la începutul procesului de biosinteză, sterilizată prin ultrafiltrare pe membrane, iar concentrația a variat între 0 și 15% vol. Biomasa obținută în timpul procesului de biosinteză a fost separată prin centrifugare și supusă procesului de extracție.

Fiecare experiment a fost efectuat de cel puțin trei ori, în condiții identice de lucru, pentru rezultatele obținute utilizându-se valoarea medie a parametrilor măsurați. Eroarea experimentală maximă a variat între $\pm 4,22$ și $\pm 5,08\%$.

V.2. Sistemul de fermentație discontinuă

Prezența oxigen-vectorului în lichidul de fermentație facilitează consumul substratului glucidic în primele ore ale procesului de biosinteză. Astfel, din figura 40 se poate observa că la o concentrație a oxigen-vectorului mai mare de 10% vol. este redusă viteza de consum a substratului glucidic.

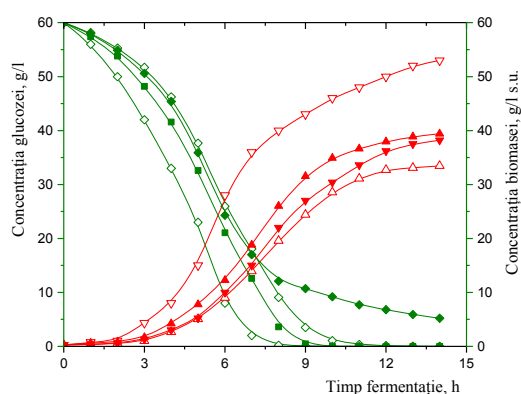


Figura 40. Variația concentrației glucozei și a concentrației biomasei în timpul procesului de fermentație discontinuă (glucoză: □ – pentru 0% vol. n-dodecan, ■ – pentru 5% vol. n-dodecan, ◇ – pentru 10% vol. n-dodecan, ◆ – pentru 15% vol. n-dodecan; biomasă: △ – pentru 0% vol. n-dodecan, ▲ – 5 pentru % vol. n-dodecan, ▽ – pentru 10% vol. n-dodecan, ▼ – pentru 15% vol. n-dodecan).

Această variație în ceea ce privește consumul glucozei în prezența diferitelor fracții volumice ale oxigen-vectorului (valori mai mici de 10% vol., respectiv mai mari de 10% vol.) apar ca urmare a efectelor hidrocarburii asupra cantității oxigenului dizolvat din lichidul de fermentație, precum și a metabolismului celulelor levuriene.

Prezența n-dodecanului conduce la o creștere a concentrației oxigenului dizolvat și a coeficientului de transfer de masă al oxigenului în lichidul de fermentație, având un efect pozitiv asupra creșterii biomasei și a vitezei de consum al substratului glucidic.

Cu toate acestea însă, la o fracție volumică a n-dodecanului de 15% vol., consumul glucozei este încetinit ca urmare a două fenomene posibile: pe de o parte, efectul inhibitor imprimat asupra celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* de către n-alkanii cu lanț mai mare de 8 atomi de C și, pe de altă parte, de abilitatea celulelor drojdiilor de a consuma n-dodecanul ca sursă suplimentară de carbon și energie.

Pe parcursul tuturor proceselor de biosinteză, variația concentrației biomasei este asemănătoare indiferent de fracția volumică a n-dodecanului.

Nivelul concentrației oxigenului dizolvat în lichidul de fermentație controlează atât creșterea biomasei, cât și echilibrul metabolic dintre utilizarea glucozei pentru producerea de energie, de dioxid de carbon, de apă metabolică, și de biosinteză a etanolului.

Ca urmare a metabolismului specific, *Saccharomyces cerevisiae* face parte din categoria drojdiilor „Crabtree-pozitive”, acest microorganism fiind capabil să biosintetizeze etanol, în condiții aerobe, utilizând ca substrat glucoza. În aceste situații, *Saccharomyces cerevisiae* este capabilă să biosintetizeze etanol atât în absența, cât și în prezența n-dodecanului (figura 41).

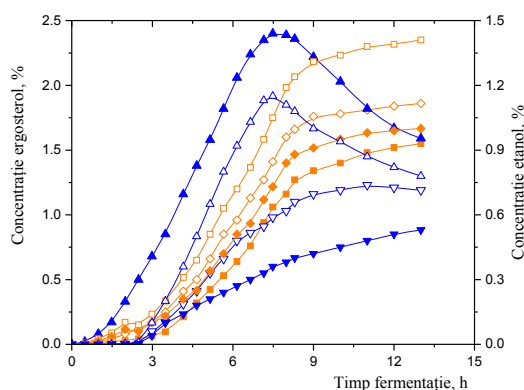


Figura 41. Variația concentrației ergosterolului și a concentrației etanolului în timpul procesului de fermentație discontinuă (**ergosterol**: ■ – pentru 0% vol. n-dodecan, □ – pentru 5% vol. n-dodecan, ◇ – pentru 10% vol. n-dodecan, ◆ – pentru 15% vol. n-dodecan; **etanol**: ▲ – pentru 0% vol. n-dodecan, △ – pentru 5% vol. n-dodecan, ▽ – pentru 10% vol. n-dodecan, ▼ – pentru 15% vol. n-dodecan).

Analizând biosinteza ergosterolului în sistemele de fermentație cu oxigen-vector, s-a stabilit că cea mai mare cantitate de ergosterol (2,3%) s-a atins la 14 ore de fermentație, în prezența a 5% vol. n-dodecan, în timp ce cea mai mică cantitate de ergosterol (1,6%), în aceleași condiții experimentale, s-a atins în prezența a 15% vol. n-dodecan. În sistemul de fermentație

fără oxigen-vector, cantitatea maximă de ergosterol atinsă la sfârșitul perioadei de fermentație a fost de 1,3% (figura 41).

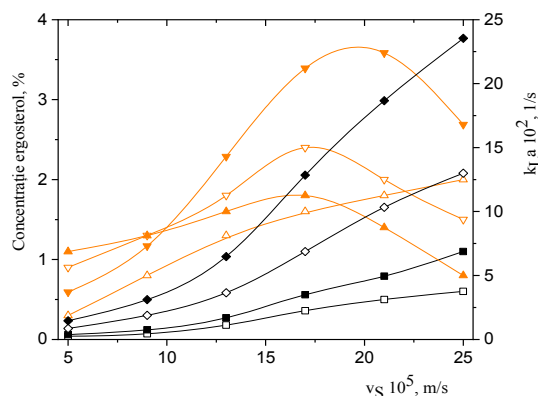


Figura 42. Variația concentrației ergosterolului și a k_{La} în funcție de viteza de aerare în procesul de fermentație discontinuă (ergosterol: \triangle – pentru 0% vol. n-dodecan, ∇ – pentru 5% vol. n-dodecan, ∇ – pentru 10% vol. n-dodecan, \triangle – pentru 15% vol. n-dodecan; k_{La} : \square – pentru 0% vol. n-dodecan, \blacksquare – pentru 5% vol. n-dodecan, \diamond – pentru 10% vol. n-dodecan, \blacklozenge – pentru 15% vol. n-dodecan).

Cantitatea maximă de ergosterol produsă de celulele de drojdie corespunde unei viteze superficiale a aerului de $21 \cdot 10^{-5}$ m/s pentru 5% vol. n-dodecan și până la $17 \cdot 10^{-5}$ m/s pentru 10 și 15% vol. hidrocarbură (figura 42). În același timp, la o viteză de aerare de peste $9 \cdot 10^{-5}$ m/s, cea mai importantă concentrație de ergosterol a fost înregistrată pentru 5% vol. n-dodecan.

Aceste rezultate confirmă rolul decisiv al fenomenului de inhibiție care se produce la concentrații mari ale oxigenului. Prin intensificarea aerației la concentrații ale n-dodecanului de peste 10% vol., pragul pentru inducerea efectului inhibitor al oxigenului este atins mult mai repede și devine foarte important la o viteză superioară de aerare. Din acest motiv, la o viteză superficială a aerului de $25 \cdot 10^{-5}$ m/s, biosinteza ergosterolului pentru fermentația fără hidrocarbură depășește pe cea obținută în fermentație cu 10 și 15% vol. hidrocarbură. La această valoare a vitezei de aerare și în condițiile experimentale date, concentrația maximă de ergosterol a fost atinsă la 5% vol. n-dodecan, din cauza efectelor inhibitorii mai puțin importante ale hidrocarbunii și ale oxigenului, comparativ cu celelalte concentrații experimentale ale hidrocarbunii.

V.3. Sistemul de fermentație semicontinuă

Atunci când valoarea concentrației glucozei a atins 10 g/l, în lichidul de fermentație a fost adăugat suplimentar substrat glucidic. Indiferent de fracția volumică a n-dodecanului adăugat în lichidul de fermentație, concentrația biomasei a crescut semnificativ. Această creștere a biomasei ca urmare a prezenței n-dodecanului în lichidul de fermentație a fost diferită în cele două sisteme de fermentație utilizate. Astfel, în sistemul de fermentație semicontinuă creșterea concentrației biomasei în prezența oxigen-vectorului a fost mult mai mare, comparativ cu sistemul de fermentație discontinuă, ca urmare a extinderii perioadei de creștere exponențială a biomasei.

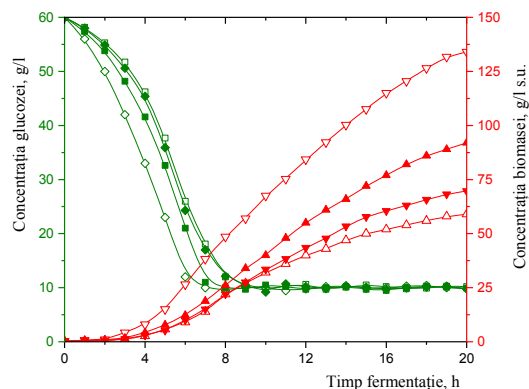


Figura 43. Variația concentrației glucozei și a concentrației biomasei în timpul procesului de fermentație semicontinuă (**glucoză**: □ – pentru 0% vol. n-dodecan, ■ – pentru 5% vol. n-dodecan, ◇ – pentru 10% vol. n-dodecan, ◆ – pentru 15% vol. n-dodecan; **biomasă**: △ – pentru 0% vol. n-dodecan, ▲ – pentru 5% vol. n-dodecan, ▽ – pentru 10% vol. n-dodecan, ▼ – pentru 15% vol. n-dodecan).

În absența oxigen-vectorului, concentrația celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* a atins o valoare de 46 g/l s.u. la 14 ore de la începutul fermentației. Prin comparație, pentru același interval de timp, pentru sistemul de fermentație discontinuă s-a atins o concentrație a biomasei de 34 g/l s.u.

Valoarea cea mai mare a vitezei de consum a glucozei s-a atins în prezența a 10% vol. n-dodecan, în timp ce valoarea cea mai mică a vitezei de consum a glucozei s-a atins la o fracție volumică de 0% și 15% vol. n-dodecan.

În sistemul de fermentație semicontinuă, prin menținerea unui nivel constant al concentrației glucozei în lichidul de fermentație (10 g/l) și în prezența oxigen-vectorului (indiferent de fracția volumică), biosinteza etanolului s-a desfășurat pe durata întregului ciclu de fermentație. În același timp, prin menținerea unui nivel constant al concentrației glucozei, se înlătură consumul etanolului ca sursă suplimentară de energie de către *Saccharomyces cerevisiae* (figura 44). Deși ergosterolul a fost biosintetizat pe toată durata procesului de fermentație, viteza biosintezei acestui compus depinde de prezența și de concentrația oxigen-vectorului din lichidul de fermentație (figura 44). Astfel, în sistemul de fermentație semicontinuă, la o fracție volumică de 10% vol. n-dodecan, concentrația ergosterolului atinge o valoare maximă, comparativ cu sistemul de fermentație discontinuă, unde o concentrație maximă a ergosterolului este atinsă în prezența unei fracții volumice de 5% n-dodecan.

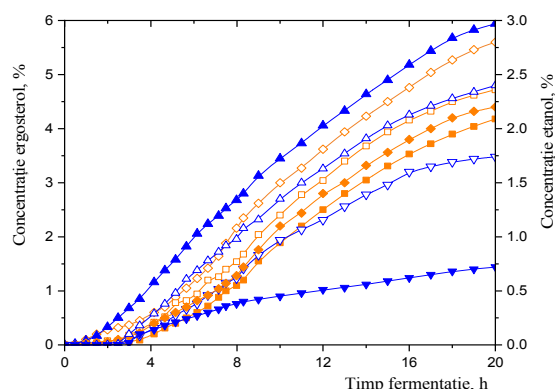


Figura 44. Variația concentrației ergosterolului și a concentrației etanolului în timpul procesului de fermentație semicontinuă (**ergosterol:** ■ – pentru 0% vol. n-dodecan, □ – pentru 5% vol. n-dodecan, ◇ – pentru 10% vol. n-dodecan, ◆ – pentru 15% vol. n-dodecan; **etanol:** ▲ – pentru 0% vol. n-dodecan, △ – pentru 5% vol. n-dodecan, ▽ – pentru 10% vol.n-dodecan, ▼ – pentru 15% vol. n-dodecan).

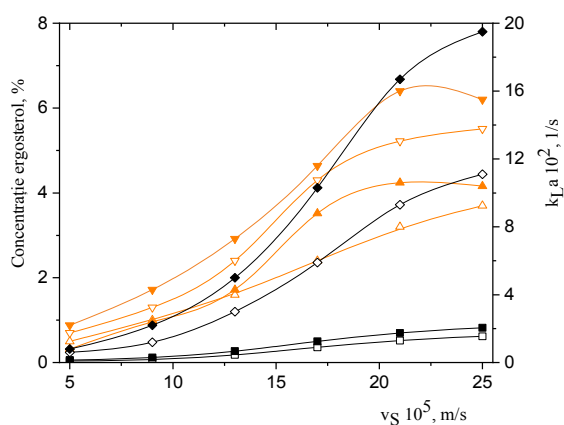


Figura 45. Variația concentrației ergosterolului și a k_{La} în funcție de viteza de aerare în procesul de fermentație semicontinuă (ergosterol: △ – pentru 0% vol. n-dodecan, ▼ – pentru 5% vol.n-dodecan, ▽ – pentru 10% vol. n-dodecan, ▲ – pentru 15% vol. n-dodecan; k_{La} : □ – pentru 0% vol. n-dodecan, ■ – pentru 5% vol. n-dodecan, ◇ – pentru 10% vol. n-dodecan, ◆ – pentru 15% vol. n-dodecan).

În figura 45 se poate observa că valoarea coeficientului de transfer de masă al oxigenului crește de câteva ori odată cu mărirea fracției volumice a n-dodecanului de la 0 la 15% vol., acest efect devenind mai pronunțat la o viteză superficială a aerului mai mare. Astfel, la o viteză a aerăției de $5 \cdot 10^{-5}$ m/s, raportul dintre valoarea k_{La} la o fracție volumică de 15% vol. n-dodecan și valoarea k_{La} la o fracție volumică de 0% vol. n-dodecan este 4,4. La o viteză de aerăție mai mare ($25 \cdot 10^{-5}$ m/s), valoarea acestui raport este de 6,2.

Concentrația ergosterolului în interiorul celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* variază cu viteza aerăției. Această variație este rezultatul efectelor valabile și pentru fermentația discontinuă, iar dependența dintre cele două procese în cazul variației acestor parametri sunt asemănătoare (figura 45). Pe lângă această asemănare, din cadrul celor două procese de

fermentație, cu privire la variația concentrației ergosterolului cu viteza de aerajie, prin modificarea acestui ultim parametru, de la 5 la $25 \cdot 10^{-5}$ m/s, se observă cum ergosterolul atinge un maxim al concentrației, dar și în prezența n-dodecanului (figura 45). Astfel, se atinge o concentrație maximă a ergosterolului la o viteză de aerajie de $25 \cdot 10^{-5}$ m/s și în prezența a 5% vol. n-dodecan, în timp ce aceeași concentrație a ergosterolului în prezența a 10 și 15% vol. n-dodecan se atinge la o viteză de aerajie de $21 \cdot 10^{-5}$ m/s.

Efectul oxigen-vectorului asupra biosintezei ergosterolului este analizat și prin intermediul factorului de amplificare (Factorul R). Factorul de amplificare reprezintă raportul dintre concentrația ergosterolului în fermentația semicontinuă și concentrația ergosterolului în fermentația discontinuă (figura 46).

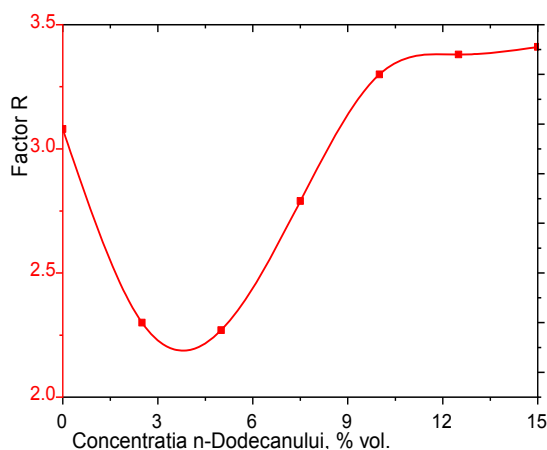


Figura 46. Influența concentrației n-dodecanului asupra factorului de amplificare.

În acord cu discuțiile precedente, efectul inhibitor al hidrocarburii apare la fracții volumice ale n-dodecanului mai mari de 10% vol. și limitează astfel biosinteza ergosterolului în ambele tipuri de fermentație (discontinuu și semicontinuă). În consecință, la aceste fracții volumice ale hidrocarburii (mai mari de 10% vol.), factorul de amplificare atinge un nivel constant în jurul valorii de 3,3. Această valoare a factorului de amplificare indică faptul că efectul inhibitor al concentrațiilor n-dodecanului mai mari de 10% vol. este atenuat de cantitatea mare a biomasei existentă în fermentația semicontinuă.

V.4. Corelații matematice pentru biosinteza ergosterolului în prezența oxigen-vectorului

Rezultatele datelor experimentale corespunzătoare sistemelor de fermentație analizate pentru biosinteza ergosterolului au reprezentat premisele propunerii a două modele matematice care să descrie influența concentrației oxigen-vectorului, a concentrației glucozei, a vitezei superficiale a aerului și a duratei fermentației asupra concentrației de ergosterol din interiorul celulelor de *Saccharomyces cerevisiae*.

Expresia generală a ecuațiilor propuse a fost următoarea (ecuația 34):

$$C_E = \alpha \cdot C_{OV}^\beta \cdot C_G^\gamma \cdot v_s^\delta \quad (34)$$

unde:

C_E - concentrația ergosterolului (procent corespunzător masei celulare de substanță uscată), %

C_{OV} - fracția volumică a n-dodecanului utilizat (%vol.)

C_G - concentrația glucozei, kg/m³

v_s - viteza superficială a aerului, m/s

$\alpha, \beta, \gamma, \delta$ - coeficienți și exponenți, dependenți de condițiile de fermentație.

Valorile coeficienților $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ au fost calculate prin metoda multiregresiei, utilizând programul informatic MATLAB.

Astfel, s-au obținut următoarele corelații:

a. pentru procesul de fermentație discontinuă (ecuația 35):

$$C_E = 2,57 \cdot 10^{-2} \cdot \frac{C_{OV}^{0,93} \cdot v_s^{0,16}}{C_G^{6,4 \cdot 10^{-2} \cdot t_F}} \quad (35)$$

b. pentru procesul de fermentație semicontinuă (ecuația 36):

$$C_E = 0,87 \cdot \frac{C_{OV}^{0,63} \cdot v_s^{0,15}}{C_G^{4 \cdot 10^{-2} \cdot t_F}} \quad (36)$$

unde t_F - durata fermentației, h.

Ecuațiile propuse (35 și 36) sunt valabile pentru următoarele domenii de variație ale parametrilor studiați: $C_{OV} \in [0, 0,15]$, $C_G \in [0, 60]$, $v_s \in [5 \cdot 10^{-5}, 25 \cdot 10^{-5}]$ și oferă o bună corelație cu datele experimentale, deviația medie fiind $\pm 5,94\%$ pentru fermentația discontinuă și $\pm 4,18\%$ pentru fermentația semicontinuă. Influențele parametrilor analizați anterior precum și importanța fiecăruia în cadrul unui proces de fermentație sunt indicate de semnul și mărimea exponenților corespunzători.

După cum s-a precizat anterior, în cazul fermentațiilor discontinue fracția volumică a hidrocarburii are o influență pozitivă semnificativă, rezultat al unei concentrații mai reduse de substrat, în timp ce influența vitezei superficiale a aerului este similară în ambele sisteme de fermentație.

V.5. Concluzii

Indiferent de fracția volumică a n-dodecanului prezent în lichidul de fermentație, prin menținerea unui nivel constant al concentrației glucozei (10 g/l) în sistemul de fermentație semicontinuă, concentrația biomasei a fost superioară comparativ cu sistemul de fermentație discontinuă, ca urmare a prelungirii perioadei de creștere exponențială a masei celulare. În același timp, concentrația ergosterolului atinge o valoare de peste două ori mai mare comparativ cu sistemul de fermentație discontinuă, iar această diferență devine și mai accentuată în prezența

oxigen-vectorului. Mai mult, în sistemele de biosinteză unde s-a utilizat oxigen-vector, prin menținerea constantă a concentrației glucozei, hidrocarbura nu a mai fost consumată de către biomasă ca sursă suplimentară de carbon și energie.

O cantitate mare a biomasei induce o limitare mai puternică a difuziei oxigenului dinspre bulele de aer către celulele microbiene ca efect al creșterii vîscozității aparente a lichidului de fermentație și a frecvenței interacțiunilor de tip adsorbție între picăturile de hidrocarburi - asociațiile celulelor de drojdie și bulele de aer. Din acest motiv, în sistemul de fermentație semicontinuă a fost necesară o concentrație mai mare a oxigen-vectorului pentru a se atinge conținutul maxim de ergosterol.

În același timp, rezultatele experimentale au demonstrat că peste o anumită concentrație a n-dodecanului în lichidul de fermentație se manifestă efectul inhibitor al hidrocarbunii asupra creșterii biomasei și al metabolismului *Saccharomyces cerevisiae*, fapt ce conduce la reducerea biosintezei ergosterolului. Prin menținerea unei concentrații constante a substratului glucidic în lichidul de fermentație, ca urmare a unei concentrații ridicate a biomasei, este diminuat efectul negativ al acumulării etanolului asupra biosintezei ergosterolului.

Factorul de amplificare indică valori supraunitare pentru întregul domeniu de concentrații al oxigen-vectorului, subliniind astfel eficiența sistemului de fermentație semicontinuă în ceea ce privește acumularea biomasei levuriene și biosinteza ergosterolului. Prin intermediul rezultatelor corespunzătoare sistemelor de fermentație analizate pentru biosinteza ergosterolului, au fost propuse două modele matematice care au descris influența concentrației oxigen-vectorului, a concentrației glucozei, a vitezei superficiale a aerului și a duratei fermentației asupra concentrației totale de ergosterol rezultat în urma procesului de biosinteză cu *Saccharomyces cerevisiae*.

Aceste modele matematice au permis predicția valorilor concentrației de ergosterol în celulele de *Saccharomyces cerevisiae* pe baza influențelor discutate.

Modelele au oferit o bună concordanță cu rezultatele experimentale, abaterile medii variind între $\pm 4,18\%$ pentru sistemul de fermentație semicontinuă și $\pm 5,94\%$ pentru sistemul de fermentație discontinuă.

CAPITOLUL VI

Studiul influenței oxigen-vectorului asupra eficienței biosintezei acidului fumaric

Acidul fumaric (acidul trans-butendioic) este un acid dicarboxilic cu patru atomi de carbon, are o largă răspândire în natură, fiind produs de anumite specii de ciuperci, licheni și plante. Acidul fumaric a fost pentru prima dată izolat din *Fumaria officinalis* (Familia Papaveraceae) [Roa Engel *et al.*, 2008], plantă după care compusul a fost denumit. Această specie face parte din categoria plantelor medicinale cu importante aplicații curative și este considerată o sursă majoră de acid fumaric.

Controlul oxigenului dizolvat în lichidul de fermentație în timpul procesului de biosinteză este considerat foarte important pentru biosinteza acizilor organici. Pornind de la aceste premise, în acest capitol din teza de doctorat, ne-am propus investigarea potențialului efect pozitiv al adăugării oxigen-vectorului în lichidul de fermentație în scopul **îmbunătățirii biosintezei acidului fumaric de către *Rhizopus oryzae***, precum și investigarea potențialului **efect pozitiv al utilizării peleților** în cadrul proceselor de biosinteză. În acest sens, s-a utilizat drept oxigen-vector n-dodecanul și s-a analizat, în mod comparativ, influența adăugării în diferite concentrații a hidrocarburi, în sistemele de fermentație aerobe. Procesul central al fiecărui experiment a fost reprezentat de etapa de fermentație aerobă din bioreactorul cu amestecare mecanică, iar microorganismul utilizat a fost fungul filamentos *Rhizopus oryzae* (Clasa Zygomycetes), tulpina ATCC 20344. Au fost realizate culturi celulare pe plăci cu extract de drojdie și malț agarizat care au fost ulterior incubate la 35°C, 7 zile, în vederea sporulării.

Fiecare experiment a fost efectuat de cel puțin trei ori, în condiții identice de lucru, pentru rezultatele obținute utilizându-se valoarea medie a parametrilor măsurați.

VI.2. Sisteme de fermentație aerobă fără oxigen-vector

În conformitate cu literatura de specialitate există o legătură directă între morfologia fungilor și biosinteza acidului fumaric. Aceste asociații celulare specifice, peleții, sunt deosebit de eficiente pentru procesul de biosinteză al acidului fumaric deoarece hifele specifice microorganismului nu se mai pot înfășura în jurul agitatoarelor, reducându-se considerabil, de asemenea și vâscozitatea lichidului de fermentație. Astfel, morfologia biomasei reprezintă un factor decisiv al performanței procesului de biosinteză al acidului fumaric. Peleții sunt mase sferice sau elipsoidale de hife cu o structură internă fluctuantă, variind de la diverse structuri

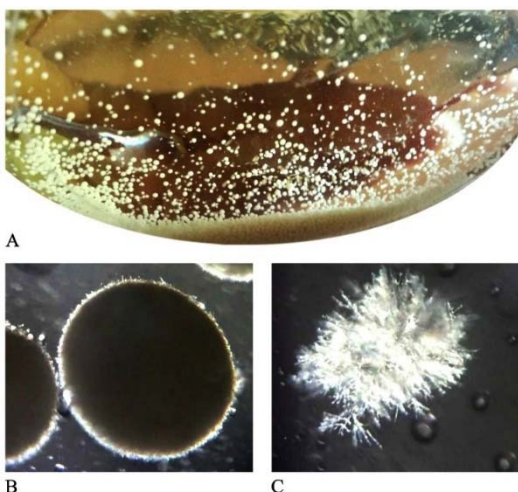


Figura 48. A. Peleți de *Rhizopus oryzae* hifale, peleții aerati, peleți denși, peleți compacti după 24 h de incubare, B. pelet după 24 ore la microscop, C. forma filamentoasă inițială (foto original).

Un alt aspect deosebit de important pentru biosinteza acidului fumaric este eficiența transferului de masă al oxigenului [Rodriguez *et al.*, 2005].

Așadar, în cadrul fermentațiilor fără n-dodecan, putem observa consumul destul de lent al glucozei în prima jumătate a perioadei de biosinteză (figura 52), însoțit de o acumulare redusă a acidului fumaric în lichidul de fermentație. În același timp, concentrația oxigenului dizolvat din lichidul de fermentație descrește puternic pe măsura dezvoltării peleților.

În ceea ce privește pH-ul, fungii se pot dezvolta în limite largi cuprinse între 1,5 și 9, cu o valoare optimă în domeniul acid, la o valoare a pH-ului cuprinsă între 5,5 și 6. Este bine cunoscut faptul că la biosinteza acidului fumaric în fermentații cu *Rhizopus*, pH-ul mediului scade foarte mult într-un interval de 24 de ore de la inoculare, de la un pH inițial de 5 la unul de 2. pH-ul puternic acid al lichidului de fermentație are un puternic efect negativ atât asupra creșterii și dezvoltării fungului *Rhizopus oryzae*, cât și asupra biosintezei acidului fumaric. În acest sens, s-a considerat necesară adăugarea în lichidul de fermentație a unui agent de neutralizare (Na_2CO_3) care să mențină un pH optim dezvoltării biomasei și a biosintezei acidului fumaric. Menținerea constantă a pH-ului la valori cuprinse între 4,8-5,1 (figura 53) pe întreaga perioadă a biosintezei a reprezentat un factor care a permis dezvoltarea peleților.

Mai mult, ca urmare a unei concentrații reduse a oxigenului dizolvat, peleții nu pot utiliza întreaga cantitate de azot disponibilă, ceea ce a condus la un proces de fermentație lent, care a fost încheiat înainte ca substratul glucidic din lichidul de biosinteză să se fi epuizat.

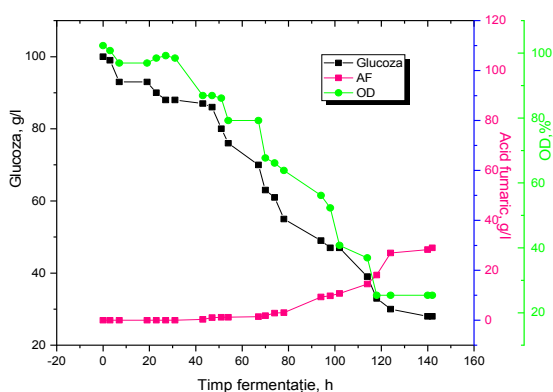


Figura 52. Variația concentrației acidului fumaric în funcție de consumul glucozei și al oxigenului dizolvat într-o fermentație fungică fără oxigen-vector.

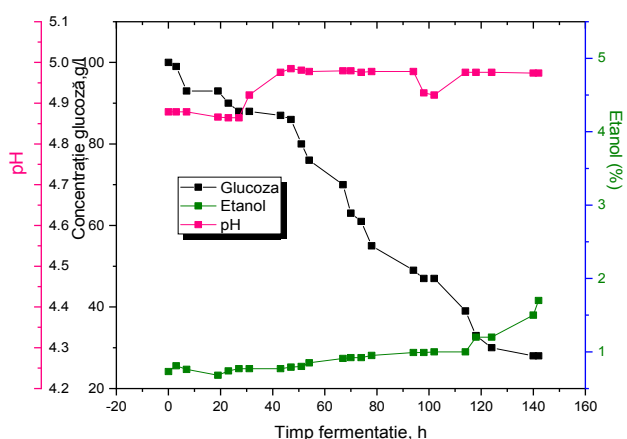


Figura 53. Variația valorii pH-ului, a concentrației glucozei și a concentrației etanolului într-o fermentație fungică fără oxigen-vector.

În condițiile în care azotul este un element esențial al metabolismului acizilor nucleici ADN și ARN, al proteinelor, un mediu de cultură sărac în sursa de azot se răsfrânge asupra

multor activități metabolice, mult mai mult decât în creșterea biomasei. În același timp, tipul sursei de azot poate influența biosinteza acidului fumaric. O sursă de azot organică, cum ar fi extractul de drojdie, are o influență pozitivă asupra creșterii masei celulare, în timp ce o sursă anorganică, cum ar fi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ determină creșterea cantității acidului fumaric.

Pe lângă sursele de N și C ale mediului de cultură, ionii metalici (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}), utilizați în proporție optimă sunt esențiali pentru dezvoltarea și activitatea metabolică a fungilor. Ionii metalici au o influență majoră asupra morfologiei fungilor filamentosi și a produsului de biosinteză [83]. Este vorba despre peleți mici, sferici cu un diametru de aproximativ 1 mm.

În același timp, pe măsură ce oxigenul dizolvat în lichidul de fermentație este consumat are loc și biosinteza etanolului (figura 53).

VI.3. Sisteme de fermentație aerobă cu oxigen-vector

Speciile genului *Rhizopus* sunt fungi aerobi care necesită o alimentare continuă cu oxigen în cadrul unui proces de biosinteză, astfel în prezența a 5% vol. n-dodecan, comparativ cu sistemul fără oxigen-vector, viteza consumului glucozei este mai pronunțată, atingându-se o concentrație maximă finală de acid fumaric în lichidul de fermentație de 33 g/l.

Se poate observa din figura 54 și din figura 55 că, după aproximativ 100 ore de fermentație, în absența n-dodecanului concentrația acidului fumaric se menține la un nivel constant, în timp ce în prezența hidrocarburii concentrația acidului fumaric este îmbunătățită. Prin adăugarea oxigen-vectorului a fost îmbunătățit consumul de glucoză. Substratul a fost complet epuizat în cadrul fermentației cu n-dodecan în decursul a 140 ore de fermentație, în timp ce pentru sistemul fără hidrocarbură, glucoza reziduală a fost de aproximativ 20 g/l.

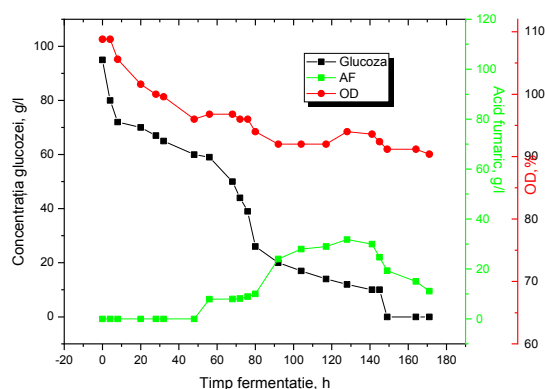


Figura 54. Variația concentrației acidului fumaric, a concentrației glucozei și a concentrației oxigenului dizolvat într-o fermentație fungică cu 5% vol. oxigen-vector.

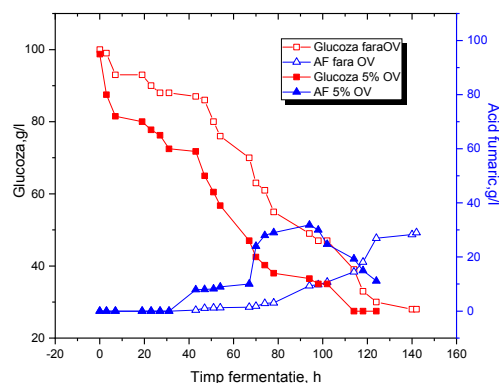


Figura 55. Variația comparativă a concentrației acidului fumaric în sisteme de fermentații fungice fără oxigen-vector și cu 5% vol. oxigen-vector.

Pentru sistemul de biosinteză care conține o fracție volumică de 10% vol. n-dodecan, se poate observa diminuarea semnificativă a concentrației glucozei în primele 60 de ore ale procesului, acest substrat fiind consumat aproape în întregime după aproximativ 80 de ore de biosinteză (figura 56).

Adăugarea n-dodecanului în lichidul de fermentație are ca efect consumul accelerat al cantității de glucoză de către *Rhizopus oryzae*, ca urmare a dezvoltării și formării peleților și ca rezultat al influenței unei disponibilități superioare a oxigenului dizolvat în sistemul de biosinteză. Consumul accelerat al substratului glucidic este urmat de creșterea exponențială a concentrației acidului fumaric, probabil și ca urmare a consumului n-dodecanului ca sursă alternativă de carbon și energie.

Cu toate acestea, la sfârșitul procesului de fermentație, concentrația acidului fumaric în lichidul de fermentație a atins o valoare de numai 23,35 g/l.

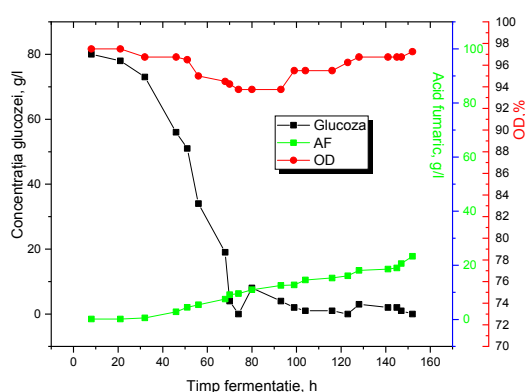


Figura 56. Variația concentrației acidului fumaric, a concentrației glucozei și a concentrației oxigenului dizolvat într-o fermentație fungică cu 10% vol. oxigen-vector.

Prin comparație, pentru sistemele de fermentație în care nu s-a folosit oxigen-vector și pentru cele în care s-a adăugat o fracție volumică a n-dodecanului de 5% vol., cantitatea de acid

fumaric biosintetizat a fost mai mare decât în sistemul de fermentație unde s-a adăugat n-dodecan într-o fracție volumică de 10% vol. (figura 57).

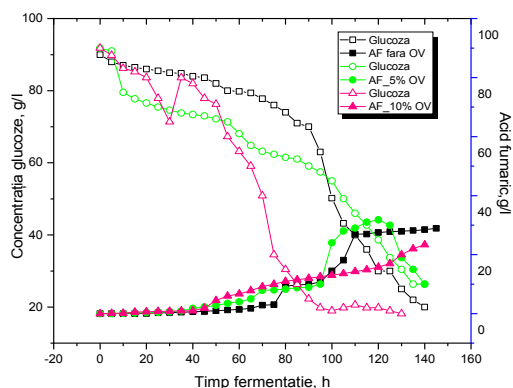


Figura 57. Variația comparativă a concentrației acidului fumaric în sistemele de fermentație fungice fără oxigen-vector, cu 5% vol. oxigen-vector și cu 10% vol. oxigen-vector.

Biosinteza acidului fumaric într-un sistem fermentativ cu *Rhizopus oryzae* este limitată de prezența și disponibilitatea oxigenului dizolvat în lichidul de fermentație. În acest sens o modalitate eficientă de a asigura un transfer de masă optim al oxigenului către biomasă este aceea de a stimula formarea peleților mici, sferici, împiedicându-se în acest mod formarea aglomerărilor hifale. În aceste condiții este limitată foarte mult creșterea vâscozității lichidului de fermentație, care are un efect negativ asupra proceselor de biosinteză în ceea ce privește transferul de masă al nutrienților și al oxigenului către biomasă.

Astfel, pe parcursul tuturor fermentațiilor realizate cu *Rhizopus oryzae*, procesele au fost controlate în vederea obținerii peleților. S-au obținut morfologii cu diametre cuprinse între 1-5 mm, în absența hidrocarburilor, în timp ce în prezența n-dodecanului, peleții au avut diametre mai mici de 1 mm (figurile 58 și 59).

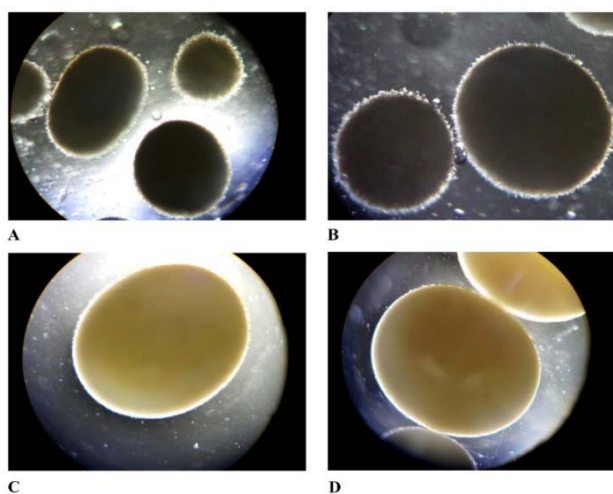


Figura 58. Evoluția peleților de *Rhizopus oryzae* în cadrul fermentațiilor cu 5% vol. oxigen-vector (A-22h, B-46h, C-94h, D-150h) (foto original).

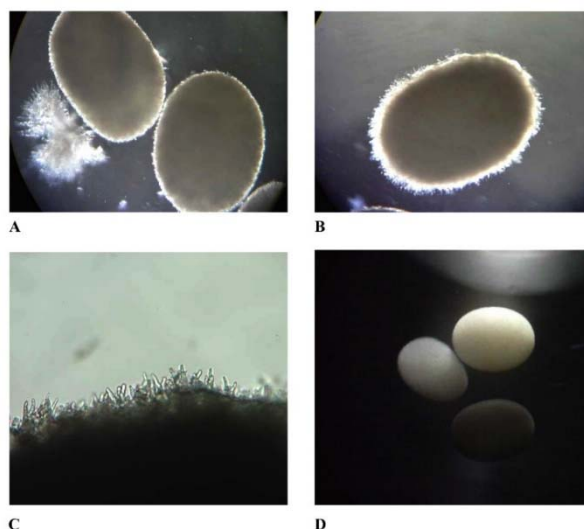


Figura 59. Evoluția peștilor *Rhizopus oryzae* în cadrul fermentațiilor cu 10% vol. oxigen-vector (A-21h, B-51h, C-99h, D-141h).

La finalul proceselor de biosinteză, s-a obținut, în medie, o concentrație a biomasei de aproximativ 4,2 g/l s.u. în sistemul fără oxigen-vector, în timp ce în prezența acestuia, la o concentrație de 5% vol. n-dodecan, s-a obținut o concentrație a biomasei de 4,5 g/l s.u., iar la o concentrație de 10% vol. hidrocarbură o concentrație a biomasei de 5,5 g/l s.u.

În sistemele unde s-au format peștii mici, cantitatea de biomasă formată a fost mai abundentă, ceea ce a condus la o concentrație maximă a acesteia de 5,5 g/l s.u. pentru sistemul cu 10% vol. n-dodecan (figura 61), efect necorelat însă cu un conținut mai mare de acid fumaric.

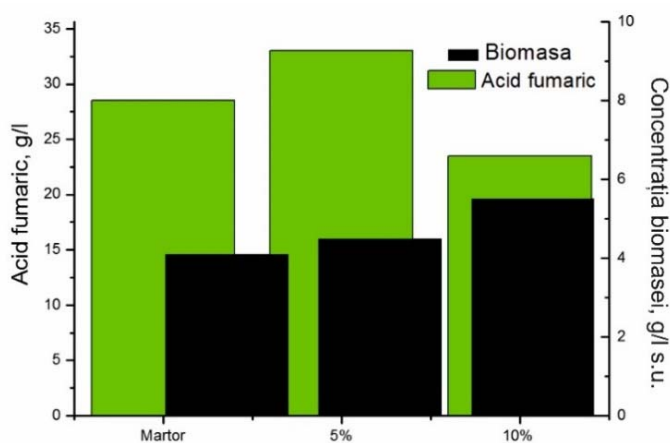


Figura 61. Analiza comparativă dintre biomasă și cantitatea acidului fumaric biosintetizat.

Potrivit figurii 63, influența pozitivă a prezenței hidrocarburii în lichidul de fermentație este corelată cu amplificarea transferului de masă al oxigenului de aproximativ 1,3 ori. Acest aspect este corelat cu mărirea fracției volumice al n-dodecanului de la 0 la 5% vol., o fracție volumică mare a hidrocarburilor conduce la apariția efectului de inhibiție a biosintezei acidului

fumaric, fapt confirmat și prin scăderea coeficientului de transfer de masă al oxigenului de circa 1,5 ori în sistemele cu 10% vol. n-dodecan.

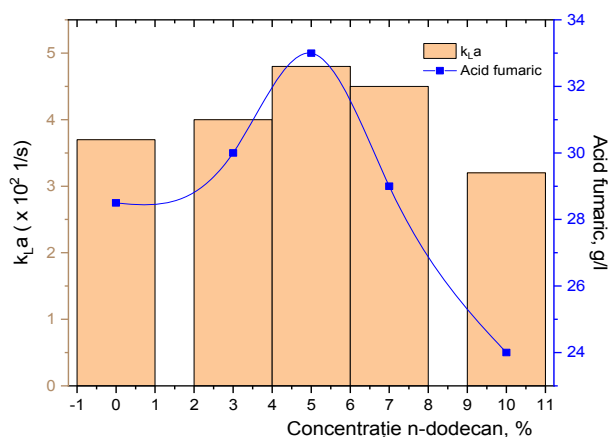


Figura 63. Influența concentrației n-dodecanului asupra coeficientului de transfer de masă al oxigenului și a concentrației acidului fumaric.

VI.4. Concluzii

Biosinteza acidului fumaric este puternic dependentă de concentrația oxigenului dizolvat din lichidul de fermentație, motiv pentru care a fost propusă o strategie de îmbunătățire a performanței procesului de biosinteză.

Concentrația hidrocarburilor are o influență semnificativă asupra biosintezei acidului fumaric. Astfel, în prezența a 5 % vol. n-dodecan, consumul de glucoză este mai pronunțat, ceea ce induce o creștere a concentrației acidului fumaric de aproximativ 1,2 ori.

Însă la o concentrație mai mare a hidrocarburi (10% vol. n-dodecan) s-a constatat un efect de inhibiție asupra biosintezei acidului fumaric.

În cadrul procesului de biosinteză al acidului fumaric cu *Rhizopus oryzae*, s-a avut în vedere obținerea și menținerea peleților, asociații celulare specifice acestor microorganisme, deosebit de eficiente ca urmare a reducerii vâscozității lichidului de fermentație.

Mai mult, prin menținerea constantă a parametrilor de lucru, s-a reușit optimizarea dimensiunii peleților sub 1 mm diametru, efect deosebit de important în vederea unui transfer de masă îmbunătățit al oxigenului, precum și evitarea în acest mod a dificultăților care ar fi putut să apară în cazul altor tipuri de morfologii caracteristice acestor microorganisme.

Prin urmare, prezența oxigen-vectorului în lichidul de fermentație a avut un rol favorabil în îmbunătățirea performanțelor procesului de biosinteză al acidului fumaric cu *Rhizopus oryzae*, fracțiile volumice ale n-dodecanului având însă un efect direct asupra dezvoltării microorganismului, precum și asupra concentrației finale al acidului fumaric.

Astfel, cantitatea maximă de acid fumaric a fost atinsă pentru 5% vol. n-dodecan, în timp ce pentru sistemele cu 10% vol. hidrocarbură în lichidul de fermentație, acidul fumaric a scăzut cu aproape 50%.

CAPITOLUL VII

Studiul influenței n-dodecanului asupra eficienței biosintezei β -galactozidazei

β -Galactozidaza (lactaza) (4-O[β -D-galactopiranozil]-D-glucopiranoză) este o enzimă responsabilă de hidroliza lactozei, precum și a tuturor compușilor β -glicozidici.

Această enzimă este un compus deosebit de important atât în industria alimentară, cât și în cea medicală. Biosinteza enzimelor este puternic influențată de condițiile de creștere: disponibilitatea nutrienților, factorii de creștere și mediul intracelular. Astfel, fermentațiile cu *Escherichia coli* sunt procese aerobe, necesitând o mare cantitate de oxigen.

Discuțiile realizate în capitolele anterioare cu privire la transferul de masă al oxigenului în diferite lichide de fermentație au indicat faptul că prezența oxigen-vectorilor în lichidul de fermentație conduce la o îmbunătățire de câteva ori a coeficientului de transfer de masă al oxigenului, magnitudinea acestui efect depinzând de concentrația hidrocarburii, de puterea de rotație și de afinitatea diferită a celulelor microorganismelor față de picăturile de hidrocarbură.

În ultimii ani, tot mai multe studii au raportat o activitate enzimatică îmbunătățită determinată de utilizarea oxigen-vectorilor pentru biosinteza diferitelor enzime.

Ținând cont de toate aceste aspecte, scopul cercetării a fost **obținerea enzimei β -galactozidaza**, precum și studiul efectelor condițiilor de creștere ale biomasei în prezența oxigen-vectorului. Pentru atingerea acestor obiective s-au realizat mai multe procese de fermentație aerobă, fiecare experiment a fost efectuat de cel puțin trei ori în condiții identice de lucru, pentru analiză fiind utilizată valoarea medie a parametrilor măsurați.

VII.1. Tehnica experimentală

Fermentațiile au fost realizate în bioreactorul de laborator Fermac 360 produs de Electrolab UK, cu o capacitate de 2 litri, 1 litru volum util, echipat cu sistem automat de măsură și control (figura 6, A).

VII.2. Metode de analiză și măsurare

Activitatea specifică a β -galactozidazei a fost calculată ca raport dintre activitatea enzimatică a β -galactozidazei și concentrația proteinelor din proba de analizat.

Fiecare experiment a fost efectuat de cel puțin trei ori, în condiții identice de lucru, pentru rezultatele obținute utilizându-se valoarea medie a parametrilor măsurați. Eroarea experimentală maximă a variat între $\pm 5,22$ și $\pm 7,08\%$.

VII.3. Modelarea biosintezei β -galactozidazei în prezența oxigen-vectorului cu ajutorul rețelelor neuronale

Pe baza datelor experimentale obținute, au fost realizate modele neuronale pentru procesele de fermentație cu *Escherichia coli*, care combină sistemele bazate pe rețele neuronale artificiale (RNA) și algoritmi pentru modelarea și optimizarea unor procese chimice complexe și anume algoritmi inspirați din comportamentul bacteriilor (BIA).

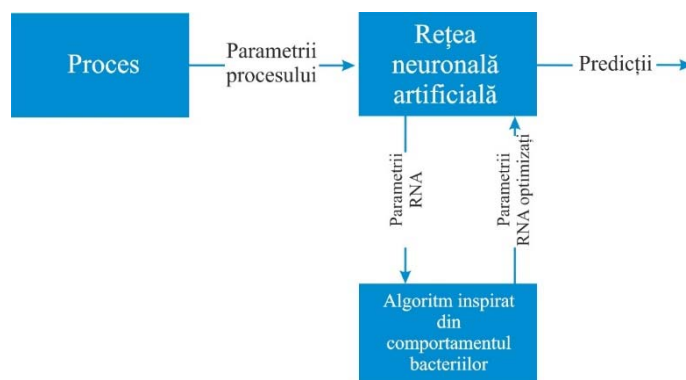


Figura 64. Schema generală a metodologiei de modelare utilizată [Ciobanu *et al.*, 2020].

VII.4. Sisteme de fermentație aerobă cu oxigen-vector

În tulpina de *Escherichia coli*, expresia a peste 200 de gene este dependentă de disponibilitatea oxigenului și, prin urmare, controlul aerăției este extrem de important. Deoarece limitarea oxigenului în faza de creștere exponențială a biomasei are un impact puternic atât asupra dezvoltării masei celulare, cât și a vitezei de creștere, oxigenul dizolvat este menținut, de obicei, la o valoare mai mare de 20% prin intensificarea agitării și a aerăției. În acest sens, pentru a menține oxigenul dizolvat la 20%, viteza de rotație se poate modifica de la 150 rpm la 400 rpm, în schimb, prin intensificarea amestecării, din cauza forțelor de forfecare dezvoltate, celulele microbiene pot fi afectate. De asemenea, va crește și consumul de energie.

Prin adăugarea n-dodecanului în lichidul de fermentație în diferite proporții, cuprinse într-un interval de 0,5 și 3% vol., fără intensificarea amestecării sau a aerării, rezultatele experimentale au indicat o creștere semnificativă a concentrației oxigenului dizolvat și a valorii coeficientului de transfer de masă al oxigenului (k_{La}).

Cu toate acestea, atunci când în lichidul de fermentație fracția volumică a n-dodecanului a fost mai mare de 2% vol., o parte din cantitatea de hidrocarbură nu a fost pe deplin dispersată în lichid, ducând astfel la formarea picăturilor de oxigen-vector care s-au acumulat la suprafața lichidului de fermentație, diminuându-se în acest mod aria disponibilă pentru transferul de masă al oxigenului.

Adaosul hidrocarburii conduce la consumul accelerat al glucozei pentru 2% vol. oxigen-vector din cauza vitezei superioare de creștere bacteriană în condițiile unei concentrații mai mari a oxigenului dizolvat. Pentru 1% vol. și 3% vol., glucoza a fost consumată cu o viteză mai

mare decât cea obținută în absența oxigen-vectorului, însă sub cea corespunzătoare adăugării a 2% vol. n-dodecan, dovedind efectul pozitiv al prezenței sale în lichidul de fermentație.

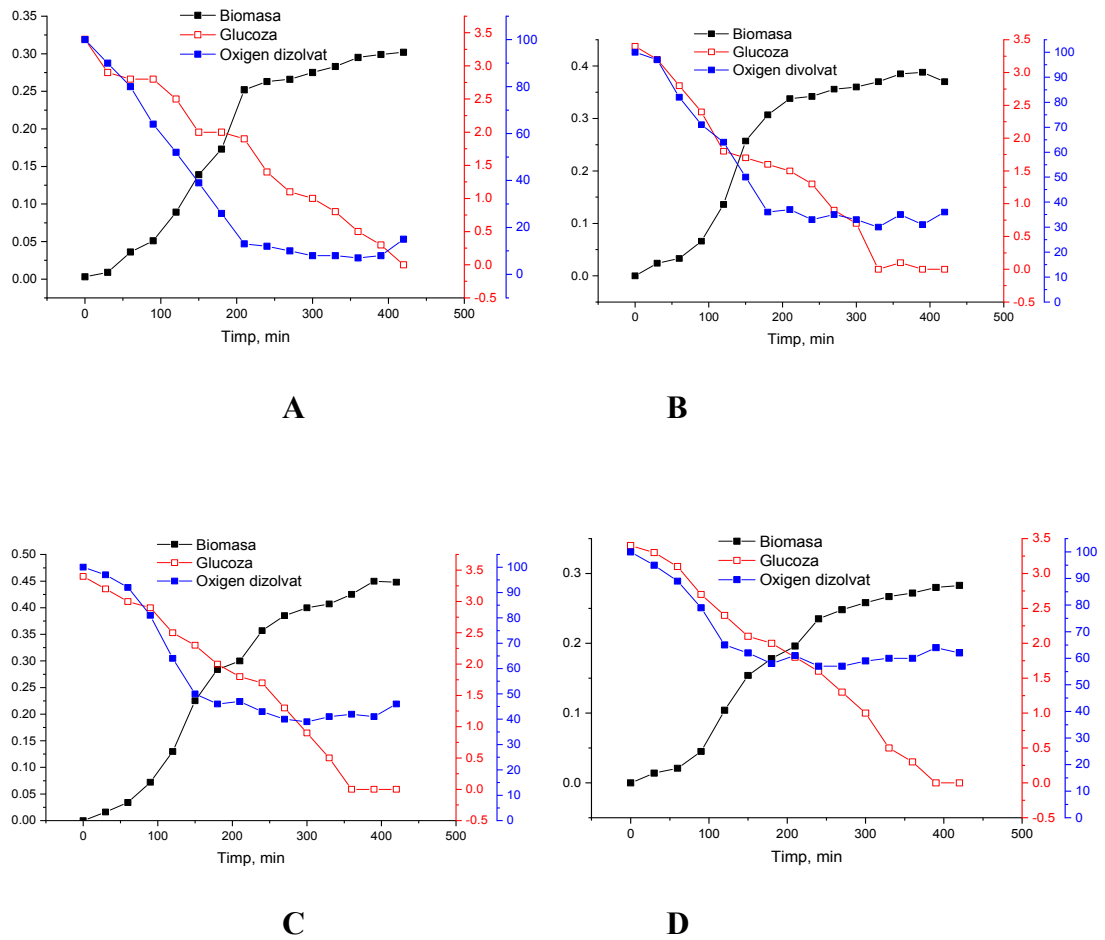


Figura 65. Rezultate comparative ale utilizării oxigen-vectorului în diferite fracții volumice în fermentații aerobe (concentrația oxigen-vectorului: **A**-0% vol., **B**-1% vol., **C**-2% vol., **D**-3% vol.).

Valoarea maximă pentru activitatea enzimatică a β -galactozidazei și a coeficientului de transfer de masă al oxigenului, k_{LA} , a fost obținută pentru o concentrație de 2% vol. n-dodecan. Fenomenul s-ar putea explica prin reprimarea biosintezei β -galactozidazei ca urmare a limitării oxigenului în timpul fazei de creștere exponențială a bacteriei (figura 66).

Comparativ cu fermentația martor, rezultatele obținute au arătat că adaosul de 2% vol. n-dodecan a cauzat o creștere a activității β -galactozidazei cu 42,88%.

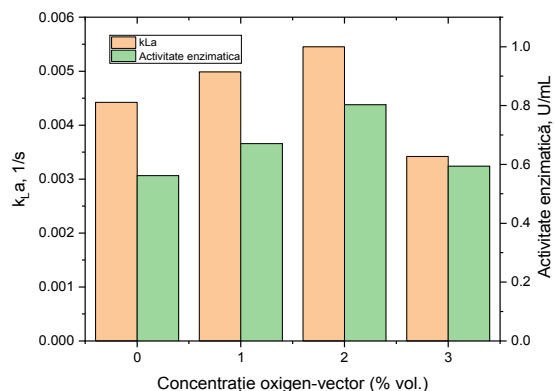


Figura 66. Influența concentrației oxigen-vectorului asupra acumulării biomasei și a activității enzimatică a β -galactozidazei.

În tabelul 4 sunt prezentate valorile k_{La} obținute în prezența, respectiv, în absența oxigen-vectorului.

Tabelul 4. Efectul adăugării unui n-alkan asupra coeficientului volumic al transferului de masă al oxigenului și al activității enzimatică.

Concentrația n-dodecanului, %vol.	0	1	2	3
k_{La_v} / k_{La_0}	1	1,12	1,23	0,77
Creșterea activității enzimatică, %	-	19	42	6

La adaosul de 2% vol. n-dodecan în fermentațiile cu *Escherichia coli*, rezultatele prezentate în figura 67 arată o creștere a vitezei specifice de creștere a microorganismului, precum și al conținutului proteinelor intracelulare.

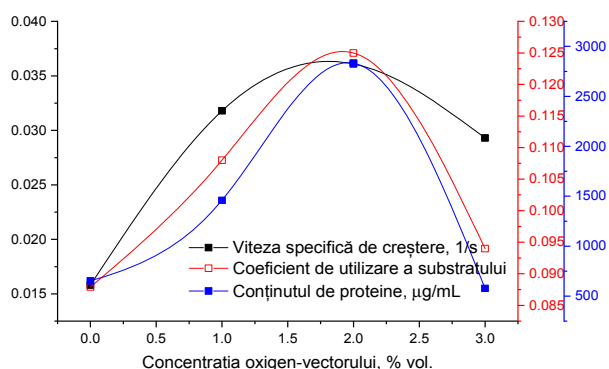


Figura 67. Influența concentrației oxigen-vectorului asupra vitezei specifice de creștere, a coeficientului de utilizare a substratului și a conținutului proteic.

Cele mai mari valori ale coeficientului de utilizare al substratului și a cantității de β -galactozidază (conținut de proteine) au fost obținute după adăugarea de 2% vol. n-dodecan, deși

consumul de glucoză a fost foarte ridicat în sistemul cu și fără oxigen-vector. Atunci când microorganismul se confruntă cu un metabolism oxidativ crescut, activitatea sa metabolică va fi stimulată pentru menținerea unui echilibru al mediului intern, în aceste condiții putându-se explica cantitatea crescută de proteine [Anisha, 2017].

Cu toate acestea, o cantitate crescută de oxigen-vector ar putea exercita asupra metabolismului celular un stres oxidativ puternic, cu un impact negativ asupra acumulării biomasei.

VII.5. Sisteme bazate pe rețele neuronale și algoritmi de optimizare inspirați din comportamentul de alimentație al bacteriilor pentru biosinteza β -galactozidazei în prezența oxigen-vectorului

Pe baza rezultatelor experimentale obținute, în vederea stabilirii celui mai potrivit model pentru fiecare parametru analizat, datele au trecut printr-o etapă de preprocesare, prin intermediul strategiei Min-Max, iar apoi au fost repartizate la întâmplare în seturi de antrenare (75%) și seturi de testare (25%).

Pentru cele mai bune modele obținute a datelor de test, a fost realizată o analiză comparativă între un set de date experimentale și predicțiile obținute pe baza sistemului bazat pe rețele neuronale artificiale (RNA) pentru activitatea enzimatică a β -galactozidazei. Pentru cele mai bune modele RNA, R^2 este aproape de 1 ($R^2 = 0,95482$), ceea ce indică o corelație strânsă între rezultatele experimentale și predicțiile RNA [Ciobanu *et al.*, 2020].

VII.6. Concluzii

Efectul n-dodecanului asupra fermentației cu *Escherichia coli* a arătat că valorile relativ ridicate ale concentrației oxigenului dizolvat induse în timpul fermentației conduc la o creștere a productivității biomasei și la un consum destul de rapid al substratului, respectiv al glucozei.

Comparativ cu fermentația martor, în care nu a fost folosit oxigen-vectorul, rezultatele privind biosinteza β -galactozidazei sugerează că adăugarea n-dodecanului în lichidul de fermentație favorizează semnificativ biosinteza biomasei și a enzimelor intracelulare specifice.

În condițiile unei concentrații mari ale oxigenului dizolvat în lichidul de fermentație, bacteria *Escherichia coli* își poate modula fluxul metabolic în favoarea creșterii biomasei.

Adăugarea n-dodecanului în lichidul de fermentație a permis accelerarea metabolismului intracelular oxidativ, care a promovat acumularea biomasei, sinteza de proteine și o pliere mai corectă a β -galactozidazei, care generează o îmbunătățire a activității enzimatice.

Prin urmare, prezența oxigen-vectorului în lichidul de fermentație a avut un rol benefic în îmbunătățirea performanțelor procesului de biosinteză a β -galactozidazei cu *Escherichia coli*, tulpina ATCC 15224, fracțiile volumice ale acestuia având un efect direct asupra dezvoltării biomasei, precum și asupra concentrației finale a compusului de biosinteză.

În plus, procesul de biosinteză a β -galactozidazei a fost modelat utilizând o metodologie care combină rețelele neuronale artificiale cu algoritmi optimizați inspirați din comportamentul

bacteriilor. Rezultatele obținute în cazul ambelor metodologii de modelare au avut corelații bune (aproape de 1) și erori absolute medii de $\pm 7,28\%$ în faza de test, fapt care sugerează că modelul dezvoltat se poate aplica cu succes atunci când se au în vedere aceleași intervale ale parametrilor procesului din cadrul acestui studiu.

CONCLUZII FINALE

Studiile experimentale realizate în cadrul tezei de doctorat au abordat o direcție actuală și de interes a ingineriei chimice și a biotehnologiei, și anume analiza și îmbunătățirea unor procese fermentative cu diverse microorganisme în sisteme polifazice gaz-lichid-lichid-solid, prin utilizarea oxigen-vectorilor.

Rezultatele studiilor experimentale cuprinse în teza de doctorat, pot fi concluzionate astfel:

1. Studiul introductiv inclus în primul capitol al tezei de doctorat, cu privire la informațiile existente în literatura de specialitate, a evidențiat principalele aspecte referitoare la transferul de masă al oxigenului în cadrul proceselor de fermentație (mecanisme și căi specifice de transfer), eficiența utilizării în cadrul biosintezelor a compușilor cu rol de oxigen-vectori, mecanismele de transfer de masă ale oxigenului în prezența oxigen-vectorilor, aplicabilitatea și valabilitatea modelelor matematice descrise pe baza unor procese fermentative cu adaos de oxigen-vectori, precum și alte procese de biosinteză în care au fost utilizați oxigen-vectorii.

2. Studiile experimentale au fost efectuate cu ajutorul unor echipamente de laborator adecvate, care au asigurat obținerea unor rezultate precise, reproductibile și care au susținut valoarea științifică ale acestora. Ulterior, datele au fost prelucrate utilizând programe specifice. Astfel, în funcție de obiectivul urmărit, echipamentele experimentale principale au constat din două bioreactoare de laborator cu amestecare mecanică cu volume de 5 litri (4 litri volum util) de tip Biostat B Braun Biotech International, respectiv 2 litri (1 litri volum util) de tip Fermac 360, Electrolab echipat cu sistem automat de măsurare și control a datelor. Caracteristicile geometrice ale bioreactoarelor și ale sistemelor de amestecare au fost prezentate în capitolul III, subcapitolul III.1 (Echipamente). Pentru urmărirea evoluției pH-ului și al oxigenului dizolvat în lichidul de fermentație s-au utilizat electrozi de pH și de oxigen de tip Metter Toledo. Valorile parametrilor urmăriți (pH, oxigen dizolvat, aerația, turația etc.) au fost înregistrate de unitatea computerizată a bioreactorului, iar valorile glucozei, ale etanolului, ale biomasei, a compușilor biosintetizați au fost măsurate cu ajutorul echipamentelor de laborator, special destinate servirii acestui scop (Analizator Labo Trace pentru cuantificare glucoză, Analizor Funker Garber pentru cuantificare etanol, Spectrofotometru UV-Vis CAMSPEC, HPLC Dionex Ultimate 3000).

3. S-au folosit lichide de fermentație simulate și lichide de fermentație reale. Lichidele de fermentație simulate au fost realizate dintr-o soluție de carboximetilceluloză sodică cu o comportare pseudoplastică și o vâscozitate aparentă cuprinsă între 10-96 cP. Lichidele de fermentație reale au fost realizate folosindu-se culturi de bacterii (*Propionibacterium shermanii*

și *Escherichia coli*, tulpina ATCC 15224), de levuri (*Saccharomyces cerevisiae*) și de fungi (*Rhizopus oryzae*, tulpina ATCC 20344).

4. În cadrul experimentelor, s-au utilizat pentru mediile de cultură necesare creșterii și dezvoltării culturilor inocul și ale celulelor microbiene din bioreactor următorii compuși: glucoza (sursa de carbon), peptona și extractul de drojdie (sursa de azot), sulfatul de amoniu, potasiu dihidrogen fosfat, sulfatul de magneziu, sulfatul de zinc, clorura de calciu, clorura de fier, clorura de sodiu, uleiul de silicon (agent antispumant) etc.

5. Oxigen-vectorul utilizat în toate studiile experimentale a fost n-dodecanul (SIGMA Chemie GmbH), alcan superior cu 12 atomi de carbon, cu aspect uleios și care prezintă numeroși izomeri de structură. Aspectele legate de proprietățile fizice ale acestui compus au fost prezentate în capitolul III. Frația volumică a n-dodecanului în lichidul de fermentație a variat între 1% vol. și 15% vol.

6. Prelucrarea datelor experimentale a fost realizată utilizând programe specifice, OriginLab și MathLab, pentru stabilirea influenței diverșilor parametri asupra proceselor de biosinteză, stabilirea influenței adăugării n-dodecanului în lichidul de fermentație asupra vitezei de transfer de masă al oxigenului, precum și pentru obținerea modelelor matematice care descriu procesele studiate.

7. Din **analiza distribuției vitezei transferului de masă al oxigenului** în diferite lichide de fermentație în prezența n-dodecanului, s-a observat faptul că adăugarea oxigen-vectorului în lichidul de fermentație determină o creștere de câteva ori a vitezei de transfer de masă al oxigenului comparativ cu sistemele de fermentație aerobă convenționale, fără a mai fi necesară o amestecare suplimentară sau o intensificare a aerației.

8. De asemenea, s-a observat că influența oxigen-vectorului asupra valorii coeficientului volumic de transfer de masă al oxigenului și al distribuției vitezei de transfer în interiorul lichidului de biosinteză depinde foarte mult și trebuie să fie analizată în corelație cu caracteristicile lichidului de fermentație (vâscozitatea aparentă și concentrația biomasei), cu parametrii de operare ai bioreactorului și, cel mai important, în acord cu afinitatea celulelor microorganismelor pentru picăturile de hidrocarbură.

9. Amplitudinea influenței factorilor studiați diferă în interiorul lichidului de fermentație de la o regiune la alta. Transferul de masă al oxigenului a fost analizat prin intermediul parametrului k_{LA} și al factorului de amplificare, raportul $(k_{LA})_v/(k_{LA})_0$, atât pentru lichide de fermentație simulate, cât și pentru lichide de fermentație reale (suspensii de *Propionibacterium shermanii* și suspensii de *Saccharomyces cerevisiae*).

10. Efectul pozitiv al adaosului n-dodecanului a fost înregistrat pentru toate cele patru poziții din interiorul bioreactorului luate în studiu, fiind mai important pentru lichidele de fermentație simulate și pentru lichidele de fermentație reale cu suspensii de *Propionibacterium shermanii*, ca urmare a absenței sau a slabei afinități a celulelor pentru picăturile de hidrocarbură. Astfel, afinitatea diferită a celulelor bacteriene și a celor levuriene pentru faza organică induce variații ale factorului de amplificare în timpul acumulării biomasei.

11. Deși valorile obținute ale variațiilor, care redau dependența dintre viteza de transfer de masă al oxigenului și puterea specifică, sunt foarte apropiate pentru cele trei sisteme studiate, influența intensificării amestecării depinde și de tipul lichidului de fermentație.

Astfel, creșterea consumului specific de putere induce o influență pozitivă asupra vitezei transferului de masă al oxigenului pentru lichidele de fermentație simulate și pentru cele care conțin suspensii levuriene cu un conținut redus de masă celulară (la partea inferioară și la cea superioară a bioreactorului), în timp ce în fermentațiile reale cu suspensii bacteriene, indiferent de poziția din interiorul bioreactorului, coeficientul de transfer de masă al oxigenului crește odată cu intensificarea amestecării, atinge o valoare maximă, apoi descrește. Această variație este mai pronunțată în cazul suspensiilor celulare mai puțin concentrate.

12. În toate cazurile studiate, influența vitezei superficiale a aerului a fost similară cu cea a influenței intensității amestecării asupra factorului de amplificare. Astfel, odată cu intensificarea vitezei de aerare, turbulența generată în sistem conduce la diminuarea factorului de amplificare, ca rezultat al reducerii gradului de acoperire al picăturilor de hidrocarbură cu bule de aer.

13. Pe baza datelor experimentale realizate s-au realizat corelații matematice care descriu și stabilesc influența diferiților factori asupra coeficientului de transfer de masă al oxigenului pentru cele patru poziții alese arbitrar din interiorul lichidului de fermentație și în funcție de sistemul studiat, au fost considerate două ecuații generale:

$$k_L a = \alpha \cdot \eta_a^\beta \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^\gamma \cdot v_s^\sigma \quad (\text{pentru lichidele de fermentație simulate});$$

$$k_L a = \alpha \cdot C_X^\beta \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^\gamma \cdot v_s^\sigma \quad (\text{pentru lichidele de fermentație reale cu suspensii de}$$

Propionibacterium shermanii și *Saccharomyces cerevisiae*).

Valorile coeficienților β , γ și δ au avut valori dependente de concentrația n-dodecanului și au fost calculați prin metoda multiregresiei utilizând programul MATLAB obținându-se următoarele corelații:

- pentru lichidele de fermentație simulate:

poziția 1	poziția 2
$k_L a = 1,18 \cdot \left[\frac{\eta_a^{1,27}}{v_s^{2,12} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{3,11}} \right]^\phi$	$k_L a = 1,12 \cdot \left[\frac{\eta_a^{3,63}}{v_s^{0,85} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{2,35}} \right]^\phi$
poziția 3	poziția 4
$k_L a = 1,72 \cdot \left[\frac{\eta_a^{1,91}}{v_s^{0,35} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{3,10}} \right]^\phi$	$k_L a = 2,17 \cdot \left[\frac{\eta_a^{2,67}}{v_s^{0,31} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{3,77}} \right]^\phi$

- pentru lichidele de fermentație reale cu suspensii de *Propionibacterium shermanii*:

poziția 1	poziția 2
$k_L a = 0,76 \cdot \left[\frac{C_X^{1,61}}{v_s^{0,46} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{3,33}} \right]^\phi$	$k_L a = 2,38 \cdot 10^{-2} \cdot \left[\frac{C_X^{2,27}}{v_s^{0,66} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{8,19}} \right]^\phi$
poziția 3	poziția 4
$k_L a = 3,81 \cdot 10^{-2} \cdot \left[\frac{C_X^{0,31} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{0,15}}{v_s^{0,66}} \right]^\phi$	$k_L a = 3,74 \cdot 10^{-2} \cdot \left[\frac{C_X^{0,15} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{0,25}}{v_s^{8,72 \cdot 10^{-3}}} \right]^\phi$

- pentru lichidele de fermentație reale cu suspensii de *Saccharomyces cerevisiae*:

poziția 1	poziția 2
$k_L a = 8,91 \cdot 10^{-2} \cdot \left[\frac{C_X^{8,46 \cdot 10^{-2}}}{v_s^{0,39} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{0,17}} \right]^\phi$	$k_L a = 7,10 \cdot 10^{-2} \cdot \left[\frac{C_X^{1,95}}{v_s^{0,74} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{3,81}} \right]^\phi$
poziția 3	poziția 4
$k_L a = 6,12 \cdot 10^{-3} \cdot \left[\frac{C_X^{0,81} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{0,11}}{v_s^{1,60 \cdot 10^{-2}}} \right]^\phi$	$k_L a = 9,16 \cdot 10^{-3} \cdot \left[\frac{C_X^{0,33} \cdot \left(\frac{P_a}{V}\right)^{0,32}}{v_s^{6,26 \cdot 10^{-2}}} \right]^\phi$

Rezultatele modelărilor matematice s-au corelat cu rezultatele experimentale (abaterea medie variind între $\pm 6,92\%$ pentru lichidele de fermentație simulate și $\pm 8,40\%$ pentru lichidele de fermentație reale cu suspensii de *Propionibacterium shermanii* și $\pm 9,73\%$ pentru suspensii de *Saccharomyces cerevisiae*).

14. Studiile cu privire la **influența oxigen-vectorului asupra biosintezei ergosterolului cu *Saccharomyces cerevisiae*** au fost realizate pentru două tipuri de fermentație, semicontinuă și discontinuă, iar fracțiile volumice ale n-dodecanului au variat între 0% vol. și 15% vol.

15. Pentru ambele tipuri de fermentație, rezultatele experimentale au arătat că adăugarea unui lichid organic netoxic la fracții volumice adecvate pentru dezvoltarea biomasei de *Saccharomyces cerevisiae* poate intensifica transferul de masă al oxigenului, îmbunătățindu-se astfel biosinteza ergosterolului. Cu toate acestea, rezultatele experimentale au demonstrat că peste o anumită concentrație a n-dodecanului în lichidul de fermentație, se manifestă efectul inhibitor al hidrocarburii asupra creșterii biomasei și al metabolismului *Saccharomyces cerevisiae*, fapt ce conduce la reducerea biosintezei de ergosterol.

16. În perioada de creștere exponențială a celulelor de *Saccharomyces cerevisiae*, indiferent de concentrația oxigen-vectorului, cantitatea de ergosterol crește puternic simultan cu creșterea semnificativă a biomasei (variație corelată cu consumul rapid al glucozei și al

oxigenului). Ca urmare a sporirii nevoii de oxigen în vederea biosintezei, concentrația de ergosterol este mai mare în sistemele de fermentație cu oxigen-vector, comparativ cu sistemul fără n-dodecan. După 9 ore de fermentație, viteza de biosinteză a ergosterolului încetinește, ca urmare a epuizării substratului glucidic și ca rezultat al efectelor negative create de hipoxie și de biosinteză a etanolului. În absența n-dodecanului, magnitudinea acestor efecte este mai pronunțată.

Prezența n-dodecanului în lichidul de fermentație combinat cu menținerea concentrației glucozei la un nivel constant în cadrul procesului de fermentație semicontinuă au determinat triplarea cantității de ergosterol biosintetizat în celulele levuriene.

17. Indiferent de fracția volumică a n-dodecanului prezent în lichidul de fermentație, prin menținerea unui nivel constant al concentrației glucozei (10 g/l) în sistemul de fermentație semicontinuă, concentrația biomasei și cea a ergosterolului a fost superioară comparativ cu sistemul de fermentație discontinuă, ca urmare a prelungirii perioadei de creștere exponențială a masei celulare (concentrația ergosterolului atinge o valoare de peste două ori mai mare comparativ cu sistemul de fermentație discontinuă).

18. Valoarea concentrației oxigen-vectorului care corespunde unei valori maxime a cantității de ergosterol depinde, în principal, de concentrația biomasei, în ciuda influenței negative a vîscozității lichidului de fermentație și a fenomenelor de blocare ale ariilor interfaciale de către adsorbția pe suprafața bulelor de aer a asociațiilor picături de hidrocarbură- celule levuriene.

În cazul unei concentrații mari a biomasei, influența pozitivă a hidrocarbunii asupra vitezei de transfer de masă al oxigenului este mai importantă la concentrații mai mari ale n-dodecanului (valoarea coeficientului de transfer de masă al oxigenului devine de aproximativ 4 ori mai mare comparativ cu sistemul de fermentație discontinuă).

19. Influența pozitivă a hidrocarbunii asupra vitezei de transfer de masă al oxigenului devine mai pronunțată la o viteză de aerajie mai mare. Astfel, prin variația vitezei aerajiei ($5 - 25 \cdot 10^{-5}$ m/s) și a fracțiilor volumice ale n-dodecanului (5-15% vol.), se atinge o concentrație maximă a ergosterolului pentru ambele tipuri de fermentație.

20. Factorul de amplificare indică valori supraunitare pentru întregul domeniu de concentrație al oxigen-vectorului, subliniind astfel eficiența sistemului de fermentație semicontinuă în ceea ce privește acumularea biomasei levuriene și biosinteza ergosterolului. La concentrații mai mari de 10% vol. ale n-dodecanului se manifestă efectul inhibitor al hidrocarbunii asupra dezvoltării biomasei și asupra biosintezei ergosterolului, pentru ambele sisteme de fermentație.

21. Prin intermediul rezultatelor corespunzătoare sistemelor de fermentație analizate pentru biosinteza ergosterolului, au fost propuse două modele matematice care au permis predicția valorilor concentrației de ergosterol în celulele de *Saccharomyces cerevisiae* pe baza influențelor discutate.

Valorile coeficienților α , β , γ , δ au fost calculate prin metoda multiregresiei, utilizând programul informatic MATLAB obținându-se următoarele corelații:

- pentru procesul de fermentație discontinuă:

$$C_E = 2,57 \cdot 10^{-2} \cdot \frac{C_{OV}^{0,93} \cdot V_S^{0,16}}{C_G^{6,4 \cdot 10^{-2} \cdot t_F}}$$

- pentru procesul de fermentație semicontinuă:

$$C_E = 0,87 \cdot \frac{C_{OV}^{0,63} \cdot V_S^{0,15}}{C_G^{4 \cdot 10^{-2} \cdot t_F}}$$

Aceste modele au oferit o bună concordanță cu rezultatele experimentale; abaterile medii variind între $\pm 4,18\%$ pentru sistemul de fermentație semicontinuă și $\pm 5,94\%$ pentru sistemul de fermentație discontinuă.

22. Studiile care au vizat **influența n-dodecanului asupra biosintezei acidului fumaric cu *Rhizopus oryzae***, tulpina ATCC 20344, au demonstrat că prezența oxigen-vectorului în lichidul de fermentație a avut un rol benefic în îmbunătățirea performanțelor procesului de biosinteză al acidului fumaric, fracțiile volumice ale n-dodecanului având însă un efect direct asupra dezvoltării microorganismului, precum și asupra concentrației finale al compusului biosintetizat.

23. Experimentele s-au desfășurat în sisteme de fermentație discontinuă, iar morfologia fungilor a fost controlată în vederea formării peleților. Fermentațiile s-au efectuat în absența și în prezența n-dodecanului.

24. În prezența a 5% vol. n-dodecan, consumul de glucoză a fost mai pronunțat, ceea ce a condus la o creștere a concentrației acidului fumaric de aproximativ 1,2 ori, în timp ce la o concentrație mai mare a hidrocarburii (10% vol. n-dodecan), s-a constatat un efect de inhibiție asupra biosintezei acidului fumaric. Acest aspect a fost considerat ca fiind efectul cumulativ negativ a doi factori: concentrația mai mare de n-alcani cu lanț de peste 8 atomi de carbon, care inhibă biosinteza acidului fumaric, și acumularea unei cantități mari a biomasei în lichidul de fermentație care defavorizează, de asemenea, biosinteza acidului fumaric.

25. Prin menținerea constantă a parametrilor de lucru, s-a reușit optimizarea dimensiunii peleților sub 1 mm diametru, efect deosebit de important în vederea unui transfer de masă îmbunătățit al oxigenului, precum și evitarea în acest mod a dificultăților care ar fi putut să apară în cazul altor tipuri de morfologii caracteristice acestor microorganisme.

26. Cantitatea maximă de acid fumaric a fost atinsă pentru 5% vol. n-dodecan, în timp ce pentru sistemele cu 10% vol. hidrocarbură în lichidul de fermentație, acidul fumaric a scăzut cu aproape 50%.

27. Studiul referitor la **efectul n-dodecanului asupra fermentației cu *Escherichia coli***, tulpina ATCC 15224, a arătat că valorile relativ ridicate ale concentrației oxigenului dizolvat induse în timpul fermentației conduc la o creștere a productivității biomasei și la un consum destul de rapid al glucozei.

28. Prezența oxigen-vectorului în lichidul de fermentație a avut un rol benefic în îmbunătățirea performanțelor procesului de biosinteză a β -galactozidazei cu *Escherichia coli*, tulpina ATCC 15224, fracțiile volumice ale acestuia având un efect direct asupra dezvoltării biomasei, precum și asupra concentrației finale a compusului de biosinteză.

Adăugarea n-dodecanului în lichidul de fermentație a permis accelerarea metabolismului intracelular oxidativ, care a condus la acumularea biomasei, la sinteza proteică și la o pliere mai precisă a structurii β -galactozidazei, care generează o îmbunătățire a activității enzimaticе.

29. Procesul de biosinteză a β -galactozidazei a fost modelat utilizând o metodologie care combină rețelele neuronale artificiale cu algoritmi optimizați inspirați din comportamentul bacteriilor. Rezultatele obținute în cazul ambelor metodologii de modelare au avut corelații bune (aproape de 1) și erori absolute medii de $\pm 7,28\%$ în faza de test, fapt care sugerează că modelul dezvoltat se poate aplica cu succes atunci când se au în vedere aceleași intervale ale parametrilor procesului din cadrul acestui studiu.

30. Rezultatele propriilor cercetări s-au concretizat în elaborarea și publicarea a șase lucrări științifice în reviste cotate ISI și opt participări la sesiuni științifice naționale și sesiuni naționale cu participare internațională.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ȘI A PARTICIPĂRILOR ÎN CADRUL CONFERINȚELOR NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE

I. Articole publicate în reviste cotate ISI

1. A-I. Galaction, A.C. Blaga, **C.P. Ciobanu**, M. Turnea, D. Cașcaval, *Distribution of oxygen transfer rates in stirred bioreactor for different fermentation broths-oxygen-vector dispersions*, Environmental Engineering and Management Journal, 2015, 2(14), 433-447 (**factor de impact 1,186**).

2. A.C. Blaga, **C. Ciobanu**, D. Cașcaval, A-I. Galaction, *Enhancement of ergosterol production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch fermentation processes using n-dodecane as oxygen-vector*, Biochemical Engineering Journal 2018, (131), 70-76 (**factor de impact 3,475**).

3. **C. Ciobanu**, A. Tucaliuc, D. Cașcaval, M. Turnea, A-I. Galaction, *Correlation between aeration and ergosterol production by yeasts*, Environmental Engineering and Management Journal 2019, 18(12), 2747-2756 (**factor de impact 1,186**).

4. **C. Ciobanu**, A. Tucaliuc, A.C. Blaga, A-I. Galaction, D. Cașcaval, *Enhancement of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using oxygen-vector*, Studia UBB Chemia 2019, LXIV, (3), 111-120 (**ISI, fără factor de impact**).

5. **C.P. Ciobanu**, A.C. Blaga, R. Froidevaux, F. Krier, A-I. Galaction, D. Cașcaval, *Enhanced growth and β -galactosidase production on Escherichia coli using oxygen vectors*, 3 Biotech 2020, (10), 298 (**factor de impact 2,270**).

6. A-I. Galaction, A. Tucaliuc, **C. Ciobanu**, D. Cașcaval, *Fumaric acid production by Rhizopus oryzae in presence of n-dodecane as oxygen-vector*, Biochemical Engineering Journal 2020, 164, 107795 (**factor de impact 3,475**).

II. Comunicări științifice

1. M. Poștaru, L. Kloetzer, **C. Ciobanu**, A-I. Galaction, D. Cașcaval, *Fractionation of carboxylic acids mixture by succinic acid fermentation using*, International Conference on E-Health and Bioengineering, Iași, 21-23 Noiembrie 2013 (comunicare orală).

2. **C. Ciobanu**, A.C. Blaga, A. Tucaliuc, O. Farcași, D. Cașcaval, A-I. Galaction, *The study of oxygen mass transfer in tetraphasic systems: gas-liquid-liquid-solid in stirred bioreactors*, “Alexandru Ioan Cuza” University Days, Faculty of Chemistry Conference, Iași, 31 Octombrie-1 Noiembrie 2014 (poster).

3. A.C. Blaga, **C. Ciobanu**, M. Turnea, D. Cașcaval, A-I. Galaction, *Distribution of oxygen transfer rate in polyphasic system gas-liquid-liquid-solid containing simulated and real fermentation broths*, 2nd International Conference on Chemical Engineering, Iași, 5 - 8 Noiembrie 2014 (poster).

4. A.C. Blaga, A. Tucaliuc, **C. Ciobanu**, D. Cașcaval, A-I. Galaction, *Studiul obținerii ergosterolului prin biosinteza Saccharomyces cerevisiae*, Conferința națională de bioinginerie pentru studenți și tineri cercetători, ediția a XVIII-a, Iași, 14-17 Mai 2015 (poster).

5. A.C. Blaga, **C. Ciobanu**, A.Tucaliuc, A-I. Galaction, D. Cașcaval, *Increase in ergosterol content in Saccharomyces cerevisiae strain using non-conventional aeration method*, 3rd International Conference on Chemical Engineering, Iași, 09 – 11 Noiembrie 2016 (poster).

6. A.C. Blaga, **C. Ciobanu**, O. Farcași, D. Cașcaval, A-I. Galaction, *Influence of oxygen-vectors in fumaric acid fermentation using Rhizopus oryzae*, 3rd International Conference on Chemical Engineering, Iași, 09 – 11 Noiembrie 2016 (poster).

7. A. Tucaliuc, A.C. Blaga, **C. Ciobanu**, D. Cașcaval, A-I. Galaction, *Improvement of aerobic yeasts fermentation by n-dodecane addition versus hybrid process of yeasts fermentation-alcohol separation*, 4th International Conference on Chemical Engineering, Iași, 31 Octombrie-2 Noiembrie 2018 (poster).

8. **C.P. Ciobanu**, A.C. Blaga, R. Froidevaux, F. Krier, A-I. Galaction, D. Cașcaval *Improved β -galactosidase production in E coli using oxygen vectors*, 5th International Conference on Chemical Engineering, Iași, 28-30 Octombrie 2020 (poster).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

M.M.R. Da Fonseca, *Critical oxygen transfer*, Bioreactor Engineering Course Workshop Notes, Island of Albarella, Italy, 1992.

F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, *Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial process: An overview*, Biotechnology Advances 2009, 27, 153-176.

E. Dumon, H. Delmas, *Mass transfer enhancement of gas absorption in oil-in-water systems: a review*, Chemical Engineering Process 2003, 42, 419-438.

O. Vashitz, M. Sheintuch, S. Ulitzur, *Mass studies using cloned-luminous strain of Xanthomonas campestris*, Biotechnology Bioengineering 1989, 34, 671-680.

P. Calik, A.S. Demir, *Influence of controlled pH operations on recombinant benzaldehyde lyase production by Escherichia coli*, Enzyme Microbiology Technology 2006, 38, 617-627.

J.V. Littlejohns, A.J. Daugulis, *Oxygen transfer in a gas liquid system containing solids of varying oxygen affinity*, Chemistry Engineering Journal 2007, 129, 67-74.

K.L. Sorenson, *Comparative studies on oxygen mass transfer for the design and developement of a single use fermentor*, All graduate Theses and Dissertations, Chemical Engineering Commons, Paper 738, 2010, Utah State University.

D. Cașcaval, A-I. Galaction, E. Folescu, *Optimization of mixing in stirred bioreactors 1. Comparative analysis of the mixing efficiency with different radial impellers for simulated broths*, Chemical Industry and Chemical Engineering Quaterly 2007, 13(1), 1-19.

E. Folescu, A-I. Galaction, D. Cașcaval, *Study of mixing time in bioreactors by changing the electrode position*, Annals of West University of Timișoara, series of Chemistry 2005, 14(1), 1-10.

A-I. Galaction, E. Folescu, D. Cașcaval, *Studies of mixing distribution in stirred bioreactors for Saccharomyces cerevisiae*, Roumanian Biotechnological Letters 2005, 10(2), 2291-2299.

E. Folescu, A-I. Galaction, D. Cașcaval, *Optimization of mixing in stirred bioreactors 3. Comparative analysis of shear promoted by the radial impeller for anaerobic simulated broths*, Roumanian Biotechnological Letters 2007, 12(4), 3339-3350.

P.M. Doran, *Mass transfer*, Bioprocess Engineering Principles, 1st edition 1995, 190-217.

A-I. Galaction, E. Folescu, D. Cașcaval, *The effect of n-dodecane addition on oxygen transfer in stirred bioreactors for Saccharomzces cerevisiae broths*, Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly 2005, 11(1), 1-9.

J.L. Rols, J.S. Condoret, C. Fonade, G. Goma, *Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen vectors*, Biotechnology Bioengineering 1990, 35, 427-435.

D. Cașcaval, A-I. Galaction, E. Folescu, M. Turnea, *Comparative study on the effects of n-dodecane addition on oxygen transfer in stirred bioreactors for simulated, bacterial and yeasts broths*, Biochemical Engineering Journal 2006, 31, 56-66.

K.G. Clarke, L.D.C. Correia, *Oxygen transfer in hydrocarbon–aqueous dispersions and its applicability to alkane bioprocesses: A review*, Biochemical Engineering Journal 2008, 39, 405-429.

E. Dumont, Y. Andres, P. Le Cloirec, *Effect of organic solvents on oxygen mass transfer in multiphase systems: Application to bioreactors in environmental protection*, Biochemical Engineering Journal 2006, 30, 245-252.

A-I. Galaction, D. Cașcaval, M. Turnea, E. Folescu, *Enhancement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using oxygen-vectors. 2. Propionibacterium shermanii broths*, Bioprocess Biosystem Engineering 2005, 27, 263-271.

C. Oniscu., D. Cașcaval, *Inginerie Biochimică și Biotehnologie. 1. Ingineria proceselor biotehnologice*, Editura InterGlobal, Iași, 2002.

E. Folescu, A-I. Galaction, D. Cașcaval, *The effect of oxygen vectors on vitamin B₁₂ biosynthesis*, Buletinul IP Iași 2005, 51(1-2), 79-87.

C. Ciobanu, A. Tucaliuc, AC. Blaga, A-I. Galaction, D. Cașcaval, *Enhancement of fumaric acid production by Rhizopus oryzae using oxygen-vector*, Studia UBB Chemia 2019, LXIV, 3, 111-120.

A-I. Galaction, A. Tucaliuc, **C. Ciobanu**, D. Cașcaval, *Fumaric acid production by Rhizopus oryzae in presence of n-dodecane as oxygen-vector*, Biochemical Engineering Journal 2020, 164, 107795.

A-I. Galaction, D. Cașcaval, C. Oniscu, M. Turnea, *Enhancement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using oxygen-vectors. 1. Simulated fermentation broths*, Bioprocess Biosystem Engineering 2004, 26, 231-238.

A-I. Galaction, A.C. Blaga, **C.P. Ciobanu**, M. Turnea, D. Cașcaval, *Distribution of oxygen transfer rates in stirred bioreactor for different fermentation broths-oxygen-vector dispersions*, Environmental Engineering and Management Journal 2015, 2(14), 433-447.

E-N. Drăgoi, S. Curteanu, A-I. Galaction, D. Cașcaval, *Optimization methodology based on neural networks and self-adaptative differential evolution algorithm applied to an aerobic fermentation process*, Applied Soft Computing 2013, 13, 222-238.

C.Tănase, TE. Sesan, *Concepte actuale în taxonomia ciupercilor*, Editura Universității "A.I.Cuza", Iași, 2006.

A.C. Roa Engel, A.J.J. Straathof, T.W. Zijlmans, W.M.van Gulik, L.A.M.van der Wielen, *Fumaric acid production by fermentation*, mini-review, Applied Microbiology and Biotechnology 2008, 78, 379-389.

A-I. Galaction, D. Caşcaval, C. Oniscu, M. Turnea, *Prediction of oxygen transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths*, Biochemical Engineering Journal 2004, 20, 85-94.

D. Caşcaval, A-I. Galaction, M. Turnea, *Comparative analysis of oxygen transfer rate distribution in stirred bioreactor for simulated and real fermentation broths*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2011, 38, 1449-1466.

D. Caşcaval, A-I. Galaction, M. Turnea, *Comparative analysis of mixing distribution in aerobic stirred bioreactor for simulated yeasts and fungus broths*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2007, 34, 35-47.

E. Rosenfeld, B. Beauvoit, B. Blondin *et al.*, *Oxygen consumption by anaerobic Saccharomyces cerevisiae under enological conditions: effect on fermentation kinetics*, Applied and Environmental Microbiology 2003, 69(1), 113-121.

C. Ciobanu, A. Tucaliuc, D. Caşcaval, M. Turnea, A-I. Galaction, *Correlation between aeration and ergosterol production by yeasts*, Environmental Engineering and Management Journal 2019, 18(12), 2747-2756.

AC. Blaga, **C. Ciobanu**, D. Caşcaval, A-I. Galaction, *Enhancement of ergosterol production by Saccharomyces cerevisiae in batch and fed-batch fermentation processes using n-dodecane as oxygen-vector*, Biochemical Engineering Journal 2018, 131, 70-76.

R.A. Rhodes, A.J. Moyer, M.L. Smith, S.E. Kelley, *Production of fumaric acid by Rhizopus arrhizus*, Applied Microbiology and Biotechnology 1959, 7, 74-80.

F.S. Carta, C.R. Soccol, L.P. Ramos, J.D. Fontana, *Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse*, Bioresource Technology 1999, 68, 23-28.

E.N. Drăgoi, S. Curteanu, F. Leon, A-I. Galaction, D. Caşcaval, *Modeling of oxygen mass transfer in the presence of oxygen-vectors using neural networks developed by differential evolution algorithm*, Engineering Applications of Artificial Intelligence 2011, 24, 1214-1226.

G.S. Anisha, *β -Galactosidases*, Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Production, Isolation and Purification of Industrial Products, Elsevier, 2017.

C.P. Ciobanu, A.C. Blaga, R. Froidevaux, F. Krier, A-I. Galaction, D. Cascaval, *Enhanced growth and β -galactosidase production on Escherichia coli using oxygen vectors*, 3 Biotech 2020, 10(298), 1-10.