

## UTILIZAREA UNOR SURSE DE AZOT ANORGANIC ÎN PROCESUL DE FERMENTAȚIE CU *Bacillus subtilis* PRODUCĂTOR DE ALFA-AMILAZĂ

V. RUGINĂ\*, GABRIELA HEFCO\*, ZENOVIA OLTEANU\*,  
ANTOANETA TĂNASE\*, D. TĂNASE\*

**Key words:** inorganic nitrogen, sources, fermentation, alpha-amylase, pH, biosynthesis, alternative

**Abstract:** Seven inorganic nitrogen sources in the fermentation with *Bacillus subtilis* producer of alpha-amylase were studied. As a result of the experiments ammonium sulphate and ammonium phosphate have been proved favorable, depending on utilized strain other sources as suitable alternatives have been identified for fermentative process.

Cunoscută specie probiotică, *Bacillus subtilis* este și un important producător de enzime amilolitice și proteolitice. Aceste enzime pot fi valorificate, având largi aplicații în enzimologia practică de profil.

Utilizând tulpini amilolitice, au fost experimentate diferite surse de azot anorganic în fermentație în vederea cultivării lor în rețeta standard de biosinteză.

### Material și metode

S-au utilizat tulpini de *Bacillus subtilis*, cultivate în condiții sterile, pe agitator rotativ la 180 t/minut.

Rețeta de biosinteză standard a fost următoarea:

Nutrient Broth.....	8 g
Amidon.....	10 g
NaCl.....	5 g
CaCl <sub>2</sub> .....	1 g
Apă distilată.....	1000 ml

S-a ajustat pH-ul inițial la valoarea de 6,8 - 7,2.

În toate experiențele s-a lucrat cu două tulpini codificate GH<sub>42</sub> și Gh<sub>31</sub>. Cultivarea s-a realizat în flacoane Erlenmayer de 500 ml tip A cu 100 ml mediu de biosinteză, iar

---

\*Institutul de Cercetări Biologice Iași

intr-o altă variantă în flacoane de 500 ml cu trei șicane și 100 ml mediu, pentru a favoriza aerația.

Durata fermentației a fost de 40 de ore.

Toate experiențele au fost însoțite de martor pentru fiecare tulpină.

Indicii biochimici investigați au fost următorii:

- ADN (g %) utilizând metoda DISCHE modificată de BURTON,
- ARN (g %) metoda cu orcinol,
- Proteine totale (mg/ml) metoda LOWRY,
- alfa amilază ( $\mu$ moli maltoză/ml) metoda HOELTING și BERNFELD modificată,
- gama amilază ( $\mu$ moli maltoză/ml) metoda SUMYZINE,
- catalază (U/ml) metoda iodometrică,
- proteaze ( $\mu$ moli tyr/ml) metoda KUNITZ,
- biomasă (g %) metoda gravimetrică.

**Condiții experimentale:** izolarea din sol, cultivarea în tuburi de agar înclinat, cultivare în flacoane Erlenmeyer de 500 ml mediu de biomasă.

**Variante de lucru:**  $v_1$  0,3 g %,  $v_2$  0,4 g %,  $v_3$  0,5 g %,  $v_4$  0,65 g %. S-a lucrat cu următoarele surse de azot anorganic: sulfat de amoniu, fosfat de amoniu, clorură de amoniu, carbonat de amoniu, azotat de amoniu, azotat de sodiu, azotat de potasiu.

## Rezultate și discuții

Rezultatele obținute sunt sintetizate în tabelul 1 și graficul 1.

Cel șapte surse de azot anorganic experimentate pentru biosinteza alfa amilazei au reliefat o bună fermentație când a fost utilizat sulfatul de amoniu, azotatul de amoniu și în parte, azotatul de sodiu și potasiu.

În cazul sulfatului de amoniu, s-au obținut la variante 20,6 și 25  $\mu$ moli maltoză/ml față de martor, unde valorile alfa amilazei s-au situat la 15,6 și 18,3  $\mu$ moli maltoză/ml.

Sulfatul de amoniu influențează pozitiv biosinteza alfa amilazei după cum urmează: la tulpina GH<sub>42</sub> se observă o biosinteză clară la variantele ce le individualizează; performanța lor fiind notabilă și cu repercusiuni clare. Deși la  $v_1$  biosinteza este un pic mai mică, la  $v_2$ ,  $v_3$  și  $v_4$  ea este superioară martorului (martor 15,64 și 18,13  $\mu$ moli maltoză/ml iar la variante: 20,6, 25  $\mu$ moli maltoză/ml). Aceasta face ca ionul amoniu să influențeze esențial metabolismul în această direcție. Pentru viitor, este un bun câștigat în rețeta de mediu ce se va propune.

În cazul fosfatului de amoniu, situația este oarecum paradoxală, în timp ce la tulpina GH<sub>42</sub> variantele prezintă valori care sunt superioare martorului, creind impresia unei

surse potențiale viabile, tulpina  $\text{GH}_{31}$  se comportă invers, valorile la variante fiind sub martor, făcând impresia că această tulpină nu agrează fosfatul de amoniu.

În acest caz ionul amoniu influențează însăși biosinteza enzimei care este influențată negativ. Este clar că această sursă este dependentă de tulpină și în cazuri anume poate da rezultate certe.

Când a fost utilizată ca sursă clorura de amoniu, rezultatele au fost concludente. Tulpina  $\text{GH}_{42}$  reprezintă la martor valoarea de  $13,5 \mu\text{moli maltoză/ml}$  iar la  $v_1-v_4$  valori superioare martorului ( $15,2$ ;  $16,6 \mu\text{moli maltoză/ml}$ ) iar la tulpina  $\text{GH}_{31}$ , martor  $22,5 \mu\text{moli maltoză/ml}$  și  $v_1-v_4$  valori între  $19,59-13,16 \mu\text{moli maltoză/ml}$ .

În cazul folosirii azotatului de amoniu s-au obținut cele mai concludente rezultate. La martori s-au obținut  $28,2 \mu\text{moli maltoză/ml}$  iar la  $v_1$  la ambele tulpini s-a realizat o biosinteză de  $31,5 \mu\text{moli maltoză/ml}$ . Și celelalte variante au realizat biosinteze bune dar nu la nivelul lui  $v_1$ . Se justifică necesitatea unui anumit procent care introdus, influențează decisiv biosinteza. Este posibil ca influența să fie și din partea ionului amoniu dar și a surselor de azot, fapt care ar putea să fie decisiv pentru o fermentație reușită.

Utilizând carbonatul de amoniu ca sursă de azot anorganic au fost obținute cele mai slabe rezultate față de martor care a prezentat o cantitate alfa amilazică acceptabilă. În variante, două au prezentat zero, alta  $2,1 \mu\text{moli maltoză/ml}$  iar ultima  $11,4 \mu\text{moli maltoză/ml}$ . La tulpina  $\text{GH}_{31}$  rezultatele au fost la jumătatea martorului, ceea ce ne face să considerăm o anumită degradare a substanței înainte de a intra în metabolism.

Introducerea în experiment a azotatului de potasiu a influențat într-o oarecare măsură biosinteza, iar aceasta nu s-a ridicat la nivelul martorului. La tulpinile  $\text{GH}_{42}$ ,  $v_1$ ,  $v_2$ ,  $v_4$  a fost superioară martorului, iar la tulpinile  $\text{GH}_{31}$  toate variantele au fost superioare martorului ceea ce denotă o influență pozitivă a ionului de amoniu din substanță. Biosinteza este performantă în cazul azotatului de amoniu, și prezintă șanse într-o eventuală utilizare în rețeta de mediu (tulpina  $\text{GH}_{42}$  martor  $14,5 \mu\text{moli maltoză/ml}$ ,  $v_1$   $16,5$ ;  $v_2$   $16,1$ ;  $v_4$   $15,6 \mu\text{moli maltoză/ml}$ , tulpina  $\text{GH}_{31}$  martor  $10,25 \mu\text{moli maltoză/ml}$ ,  $v_1$   $11,4$ ;  $v_2$   $10,57$ ;  $v_3$   $11,9$ ;  $v_4$   $14,2 \mu\text{moli maltoză/ml}$ ).

În sfârșit, azotatul de sodiu utilizat a prezentat în cazul martorilor o valoare normală iar la variante ușoare creșteri ale activității alfa amilazice. Martor tulpina  $\text{GH}_{42}$   $12,3 \mu\text{moli maltoză/ml}$  și tulpina  $\text{GH}_{31}$   $11 \mu\text{moli maltoză/ml}$ , iar variantele între  $9$  și  $12,5 \mu\text{moli maltoză/ml}$ , tulpina  $\text{GH}_{31}$  între  $8$  și  $14 \mu\text{moli maltoză/ml}$ .

Pe ansamblu, în experiențele efectuate s-au obținut rezultate notabile, cele mai bune rezultate obținându-se când a fost utilizat sulfatul de amoniu, azotatul de amoniu și mai modeste la azotatul de sodiu și azotatul de potasiu.

De remarcat este faptul că efectele adausului de azot sunt influențate decisiv de tulpina utilizată, ca și de concentrația substanței introdusă în experiment.

### Concluzii

1. În experimente au fost utilizate următoarele surse de azot organic: sulfat de amoniu, fosfat de amoniu, azotat de amoniu, azotat de potasiu, azotat de sodiu, clorură de amoniu și carbonat de amoniu.

2. În toate experimentele au fost utilizate două tulpini și anume GH<sub>41</sub> și GH<sub>31</sub>, fiecare experiment având câte un martor al fiecărei tulpini utilizate.

3. Sursele de azot anorganic ce au fost utilizate, au fost introduse în concentrațiile 0,3, 0,4, 0,5, 0,65 g%.

4. Rezultatele obținute sunt diferențiate fie datorită concentrației mici sau influenței intime a ionului considerat activ.

5. Rezultatele cele mai semnificative au fost obținute la utilizarea surselor de azot anorganic: sulfatului de amoniu, azotatului de sodiu și potasiu, azotatului de amoniu.

6. Experiențele cu diverse surse de azot anorganic s-au dovedit benefice, existând posibilități reale de îmbunătățiri a activității alfa-amilazei, produs de bază în fermentația cu *Bacillus subtilis*.

### BIBLIOGRAFIE

1. Bertrand I., 1972 – Interactions entre elements minéraux et microorganismes du sol, Rev. Ecol. Biol., Sol. IX, 349-396
2. Comnea Victoria, Milena Marica, 1976 – Studiarea fenomenului de disociere și efectul lui asupra activității alfa amilazei la tulpini de *Bacillus subtilis*, în „Lucrările primului simpozion de microbiologie industrială”, 169-176
3. Dobrotă Smaranda, Viorica Velehonschi, Daniela Bărnățeanu, 1986 – Obținerea unor preparate enzimatiche amilolitice din specia de *Bacillus subtilis*, în „Microbiologie industrială și biotehnologie”, 143-149

Tabelul 1

Influența diferitelor surse de azotat anorganic asupra biosintezii  $\alpha$ -amilazei cu *Bacillus subtilis*

Nr. crt.	Sursa de azot anorganic	Tulpină bact.	$\alpha$ - amilază ( $\mu$ mol $\bar{a}$ maltoză / ml.)				
			M	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>
1.	Sulfat de amoniu	GH <sub>42</sub>	15,64	14,91	18,57	18,57	20,61
		GH <sub>31</sub>	18,31	18,71	15,50	16,52	25,0
2.	Fosfat de amoniu	GH <sub>42</sub>	10,31	17,98	21,64	10,67	11,84
		GH <sub>31</sub>	7,2	2,78	0,14	0,14	1,02
3.	Clorură de amoniu	GH <sub>42</sub>	13,50	16,37	15,20	16,67	15,94
		GH <sub>31</sub>	22,51	19,59	13,89	13,16	16,37
4.	Azotat de amoniu	GH <sub>42</sub>	28,22	31,43	15,20	21,64	26,92
		GH <sub>31</sub>	28,22	27,78	24,12	23,98	23,39
5.	Carbonat de amoniu	GH <sub>42</sub>	10,23	11,40	2,05	0,0	0,0
		GH <sub>31</sub>	12,00	7,75	5,56	7,75	4,09
6.	Azotat de potasiu	GH <sub>42</sub>	14,62	16,52	16,08	6,16	15,64
		GH <sub>31</sub>	10,23	11,55	10,97	11,84	14,18
7.	Azotat de sodiu	GH <sub>42</sub>	12,28	8,77	12,13	10,09	10,09
		GH <sub>31</sub>	10,96	7,89	10,23	13,60	9,65

Legendă: M = martor

V = variantă

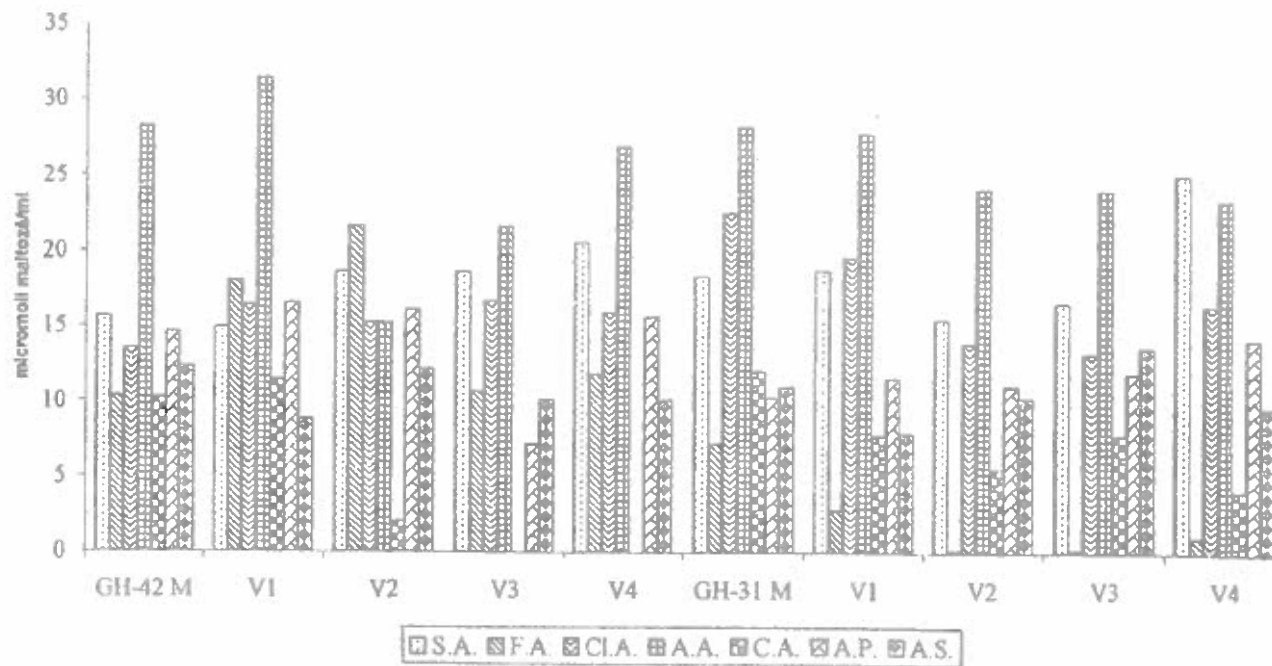


Fig. 1 – Influența diferitelor surse de azot anorganic asupra  $\alpha$ -amilazei cu *Bacillus subtilis*