



**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
A BANATULUI DIN TIMIȘOARA**



STABILIZAREA PE CALE BIOTEHNOLOGICĂ A PREPARATELOR ENZIMATICE MICROBIENE PENTRU A FI UTILIZATE CA ADITIVI FURAJERI ÎN NUTRIȚIA ANIMALELOR

Programul: IDEI

Tipul proiectului: Proiecte de cercetare exploratorie

Cod proiect: ID_1134

Contract nr. 426/01.10.2007

Director de proiect: S.I. Dr. Ing. MONICA DRAGOMIRESCU

- Enzimelor exogene = aditivi furajeri
- Necesitatea stabilizării enzimelor
- Imobilizarea enzimelor:
 - stabilizarea moleculei enzimatică
 - blocarea moleculei cu retenția activității catalitice

PLAN DE REALIZARE A PROIECTULUI

Anul	Obiective
2007	1. Documentare in publicatiile de ultima ora in tematica propusa
	2. Obținerea preparatului proteolitic stabilizat prin legare fizica pe suport anorganic
2008	1. Obținerea preparatului proteolitic stabilizat prin entrapare in gel de silice si entrapare – depunere pe suport anorganic
	2. Caracterizarea preparatelor proteazice libere si stabilizate
	3. Studiul comparativ al stabilitatii proteazelor libere si imobilizate
2009	1. Obținerea preparatelor enzimatiche cu activitate amilolitica stabilizate prin legare fizica, entrapare in gel de silice si entrapare – depunere pe suport anorganic
	2. Obținerea preparatelor enzimatiche cu activitate celulozolitica stabilizate prin legare fizica, entrapare in gel de silice si entrapare – depunere pe suport anorganic
	3. Caracterizarea preparatelor enzimatiche libere si stabilizate
2010	1. Testarea proteazelor stabilizate in biotransformari (hidroliza substraturilor lor naturale)
	2. Testarea amilazelor si celulazelor stabilizate in biotransformari (hidroliza substraturilor lor naturale)

PLAN DE REALIZARE A PROIECTULUI

2007

Obiective	Activități	Rezultate livrate pe etapă
1. Documentare în publicațiile de ultimă oră în tematica propusă	1.1. Studiul literaturii de specialitate și selectarea documentației referitoare la imobilizarea proteazelor, amilazelor și celulazelor pe suporturi anorganice, prin consultare a Chem. Abstr., Current Contents, baze de date de pe internet.	Studiu, Baza de date
	1.2. Consultarea articolelor originale, din revistele existente în dotarea bibliotecii sau prin cerere prin e-mail, redactarea unor monografii de literatură privind utilizarea enzimelor stabilizate în hrana animalelor.	Studiu, Baza de date

Realizare obiectiv 1/2007

- Studiu privind stabilizarea prin imobilizare a proteazelor, amilazelor și celulazelor pe suporturi anorganice și utilizarea lor în hrana animalelor:
 - 90 titluri bibliografice studiate
 - peste 70% din referintele bibliografice sunt din anii 2002-2007

PLAN DE REALIZARE A PROIECTULUI

2007

Obiective	Activități	Rezultate livrate pe etapă
2. Obținerea preparatului proteolitic stabilizat prin legare fizica pe suport anorganic	2.1. Testarea tulpinilor microbiene din punct de vedere al activitatii proteolitice prin realizarea de culturi la nivel de laborator.	Parametri de functionare
	2.2. Testarea suporturilor anorganice in vederea obtinerii unui produs stabilizat cu activitate proteolitica superioara si randament de imobilizare cat mai bun.	Parametri de functionare
	2.3. Optimizarea procesului de imobilizare prin legare fizica (raportul enzima/suport, temperatura si timpul de imobilizare, etc.).	Metoda de laborator

Realizare obiectiv 2/2007

Testarea unor tulpini de *Aspergillus* producătoare de proteaze

Tulpina	pH	Activitatea proteolitică (U/100 ml)		
		24 h	48 h	72 h
<i>Aspergillus oryzae</i> 14 B	5-6,5	23,70	29,48	17,93
<i>Aspergillus oryzae</i> 14 B ₁	5-6,5	16,77	23,70	20,81
<i>Aspergillus oryzae</i> 19 A	5-6,5	26,60	23,70	0
<i>Aspergillus oryzae</i> 19 A ₁	6-6,5	17,93	17,93	0

Testarea unor tulpini de *Bacillus* producătoare de proteaze

Tulpina	pH	Timpul de cultură (h)	Activitatea proteolitică (U/100 ml)
<i>Bacillus subtilis</i> USAMVB	8-8,5	48	21,97
<i>Bacillus subtilis</i> 4amy-	6,5	48	32,37
	8,5	40	43,92
<i>Bacillus globigi</i> R	5,5	48	26,59
<i>Bacillus globigi</i> S	5,5	48	-
<i>Bacillus subtilis</i> Tr 1	7,5	48	48,54
<i>Bacillus subtilis</i> Tr 2	6,5	48	-
<i>Bacillus subtilis</i> Tr 3	6,5	48	19,66
<i>Bacillus subtilis</i> B 52	5,0	40	35,25
<i>Bacillus subtilis</i> B 36	8,5	40	26,57
<i>Bacillus globigi</i> amy+	6,0	40	38,14
<i>B. licheniformis</i> B 40	6,0	48	99,50

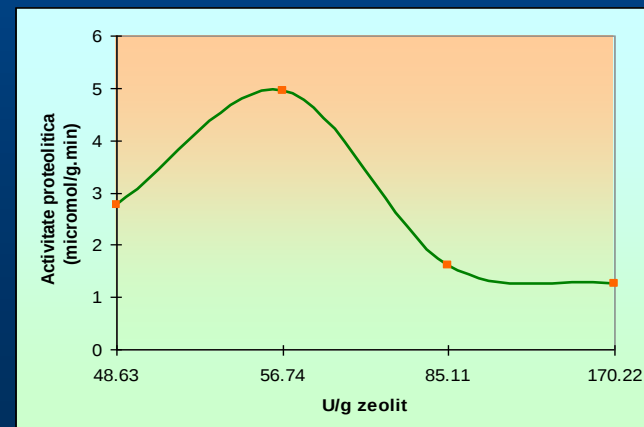
Conținutul în proteină și activitatea proteolitică a preparatului enzimatic obținut prin fermentația *Bacillus licheniformis* B40

Cultura		Conținutul în proteină $\text{mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{ml}^{-1}$	Activitate proteolitică $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$	Activitate proteolitică specifică $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$
I	24 h	2,31	0,300	0,13
	48 h	2,85	0,310	0,11
II – 48 h		2,53	0,995	0,40
III – 48 h		5,65	1,330	0,24

Influența cantității de enzimă asupra activității proteolitice a Alcalasei immobilizate prin legare fizică pe zeolit

Nr. crt.	Soluție enzimatică ml	Cantitatea de suport g	Raport enzimă/zeolit U/g _{zeolit}	Activitate proteolitică $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	Activitate relativă %	Randament de imobilizare %
1.	5,2	0,50	170,22	1,26	25,47	0,63
2.	5,2	1,00	85,11	1,61	32,58	1,90
3.	5,2	1,50	56,74	4,95	100,00	8,92
4.	5,2	1,75	48,63	2,75	55,52	5,65

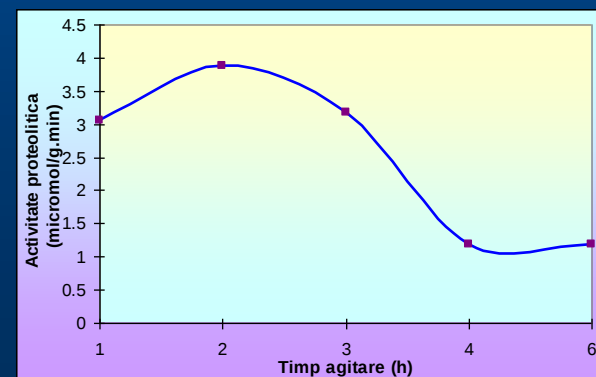
randamentul de imobilizare = $A_f \cdot 100 / A_i$, unde A_i este activitatea totală inițială, iar A_f este activitatea totală din solidele uscate



Influența timpului de agitare asupra activității proteolitice a Alcalasei imobilizate prin legare fizică pe zeolit

Nr. crt.	Timpul de agitare h	Activitate proteolitică $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	Activitate relativă %	Randament de imobilizare %
1.	1	3,05	78,52	3,49
2.	2	3,88	100,00	4,60
3.	3	3,17	81,63	3,57
4.	4	1,19	30,71	1,31
5.	6	1,18	30,42	1,27

randamentul de imobilizare = $A_f \cdot 100 / A_i$, unde A_i este activitatea totală inițială, iar A_f este activitatea totală din solidele uscate



Imobilizarea prin legare fizică a preparatului cu activitate proteolitică produs de tulpina indigenă de *Bacillus licheniformis* B40

Varianta A₁

- imobilizare sub **agitare magnetică**
- suporturi de imobilizare: zeolit, alumină
- timp de agitare - trei ore
- stabilizare peste noapte
- spălare cu acetonă răcită
- uscare la temperatura camerei și în exicator

Conținutul în proteine și activitatea proteolitică a enzimei imobilizate

Suport	Cantitate g	Conținutul în proteină $\text{mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}^{-1}$	Activitate proteolitică $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	Grad de imobilizare al proteinei ^a	Randament de imobilizare ^b %
Zeolit	1,99	2,98	0,14	0,89	9,33
Alumină	2,09	1,74	0,09	0,90	6,20

^a $G_i = (P_i - P_a)/P_i$, unde P_i este cantitatea totală de proteină inițială iar P_a este proteina din apele de spălare; ^bRandamentul de imobilizare = $A_f \cdot 100/A_i$, unde A_i este activitatea totală inițială iar A_f este activitatea totală din solidele uscate.

Varianta A₂

- Imobilizarea în coloană cromatografică
- Suport de imobilizare:
 - alumină
 - zeolit (tasare și colmatare a coloanei)
 - bentonită (tasare și colmatare a coloanei)
- randamentele de imobilizare mai mari decât în cazul în care legarea enzimei de suport s-a realizat sub agitare magnetică

Analiza preparatului enzimatic obținut după 24 ore de fermentație

Alumină	Volum ml g*	Conținutul în proteină $\text{mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{ml}^{-1}$ $\text{mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}^{-1*}$	Activitate proteolitică $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1*}$	Grad de imobilizare al proteinei ^a	Randament de imobilizare ^b %
Inițial	45	2,31	0,30	-	-
Eluatul coloanei	45	1,42	0,15		
Ape de spălare	15	1,77	0,05		
Enzima imobilizată	9,87*	1,35*	0,12*	0,13	8,53

^aGI = $(P_i - P_a)/P_i$, unde P_i este cantitatea totală de proteină inițială iar P_a este proteina din apele de spălare; ^bRandamentul de imobilizare = $A_f \cdot 100/A_i$, unde A_i este activitatea totală inițială iar A_f este activitatea totală din solidele uscate.

Analiza preparatului enzimatic obținut după 48 ore de fermentație

Alumină	Volum ml g*	Conținutul în proteină $\text{mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{ml}^{-1}$ $\text{mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}^{-1*}$	Activitate proteolitică $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1*}$	Grad de imobilizare al proteinei ^a	Randament de imobilizare ^b %
Inițial	30	2,85	0,31	-	-
Filtrat	30	1,22	0,10		
Ape de spălare	10	2,05	0,18		
Solide	9,92*	2,84*	0,13*	0,33	13,86

^aGI = (Pi – Pa)/Pi, unde Pi este cantitatea totală de proteină inițială iar Pa este proteina din apele de spălare; ^bRandamentul de imobilizare = Af·100/Ai, unde Ai este activitatea totală inițială iar Af este activitatea totală din solidele uscate.

Varianta A₃

- imobilizare sub **agitare magnetică**
- suporturi de imobilizare: **ceramică** «Procema SA»
- timp de agitare - **două** ore
- stabilizare peste noapte - **nu**
- spălare cu acetonă răcită
- uscare la temperatura camerei și în exicator

Ceramica I

- Procema S.A. - denumirea comercială PERLiflor
- fabricat din materii prime naturale (rocă perlitică), utilizat în horticultură, pomicultură și viticultură
- Aspect: produs granular cu structură celulară lipsit de impurități
- Culoare: alb – gris
- Densitate în grămadă în stare afânată și uscat: 150-250 kg/m³
- Absorbție de apă: min. 200%
- Granulometrie: min. 1,0 mm

Ceramică II

- Aspect: granule ceramice poroase
- Culoare: cărămizie
- Porozitate aparentă: min 75%
- Granulometrie: sortul I 4-6 mm, sortul II 7-10 mm, sortul III 11-16 mm
- Rezistență la agenți chimici: rezistă

Conținutul în proteine și activitatea proteolitică a enzimei imobilizate

Suportul	Cantitate g	Conținutul în proteină $\text{mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}^{-1}$	Activitate proteolitică $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	Grad de imobilizare al proteinei ^a	Randament de imobilizare ^b %
Ceramică I	58,03	3,80	0,99	0,89	74,98
Ceramică II	4,40	5,01	2,29	0,34	63,22

^aGI = $(P_i - P_a)/P_i$, unde P_i este cantitatea totală de proteină inițială iar P_a este proteina din apele de spălare; ^bRandamentul de imobilizare = $A_f \cdot 100/A_i$, unde A_i este activitatea totală inițială iar A_f este activitatea totală din solidele uscate.

PLAN DE REALIZARE A PROIECTULUI

2008

Obiective	Activități	Rezultate livrate pe etapă
1. Obținerea preparatului proteolitic stabilizat prin entrapare în gel de silice și entrapare – depunere pe suport anorganic	1.1. Optimizarea procesului de imobilizarea prin entrapare în gel de silice în funcție de raportul apă/TEOS, încărcarea cu enzima, prezenta agentului de profilare, modul de prelucrare al gelului.	Parametri de funcționare Metoda de laborator Schema tehnologica
	1.2. Punerea la punct a metodei combinate de entrapare – depunere prin utilizarea variantelor cele mai bune obținute prin legare fizică și entrapare în gel de silice.	Parametri de funcționare Metoda de laborator Schema tehnologica

Si(OR)_4 , EtOH,
 H_2O , HCl

SOL

EtOH, NH_3 ,
Solutie enzimatica tamponata

GEL

Maturare
Spalare
Uscare

XEROGEL

Sinteza sol-gel in doua etape

Precursori –tetraalcoxisilani:

- tetraetoxisilan (TEOS)
- tetrametoxisilan (TMOS)

Realizare obiectiv 1/2008

Optimizarea procesului de imobilizare prin entrapare în gel de silice

- raportul stoichiometric r apă/silan
 - $6 < r < 36$
 - $r_{\text{activitate max}} = 30$
- încărcarea cu enzimă
 - $14,19 < \text{unități enzimatică totale} < 141,85$
 - activitate și randament maxim de imobilizare - 56-114 U_{tot}
- utilizarea unor agenți formatori de pori
 - D-glucoză – $0,04 \text{ g}_{\text{glucoză}}/\text{mL}_{\text{sol}}$ - $0,16 \text{ g}_{\text{glucoză}}/\text{mL}_{\text{sol}}$
 - activitate enzimatică mărită comparativ cu a matorului
- prelucrarea xerogelului cu enzima imobilizată:
 - maturare 24 ore la temperatura camerei
 - spălare
 - filtrare la vid
 - uscare la temperatura camerei până la greutate constantă
 - mojarare pentru obținerea unor probe omogene

Stabilizarea prin metoda combinată entrapare-depunere

- combinarea avantajelor metodelor de stabilizare prin adsorbție fizică și entrapare în gel de silice
- minimizarea dezavantajelor celor două metode
- condiții optime de entrapare
- suport anorganic de depunere: ceramică

Conținutul în proteine și activitatea proteolitică a preparatului enzimatic imobilizat

Suport/ Precursor	Metoda de imobilizare	Conținutul în proteină $\text{mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}^{-1}$	Activitatea proteolitică $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	Randament de imobilizare ^a %
Ceramică	Adsorbție fizică	5.01	2.29	63.22
TEOS	Entrapare	8.31	0.31	7.40
	Entrapare (Glucoză)	4.77	1.24	72.33
	Entrapare / Depunere (Ceramică)	2.76	0.45	45.27
TMOS	Entrapare	5.24	0.27	17.08
	Entrapare (Glucoză)	5.00	0.71	57.33
	Entrapare / Depunere (Ceramică)	3.53	0.14	16.15

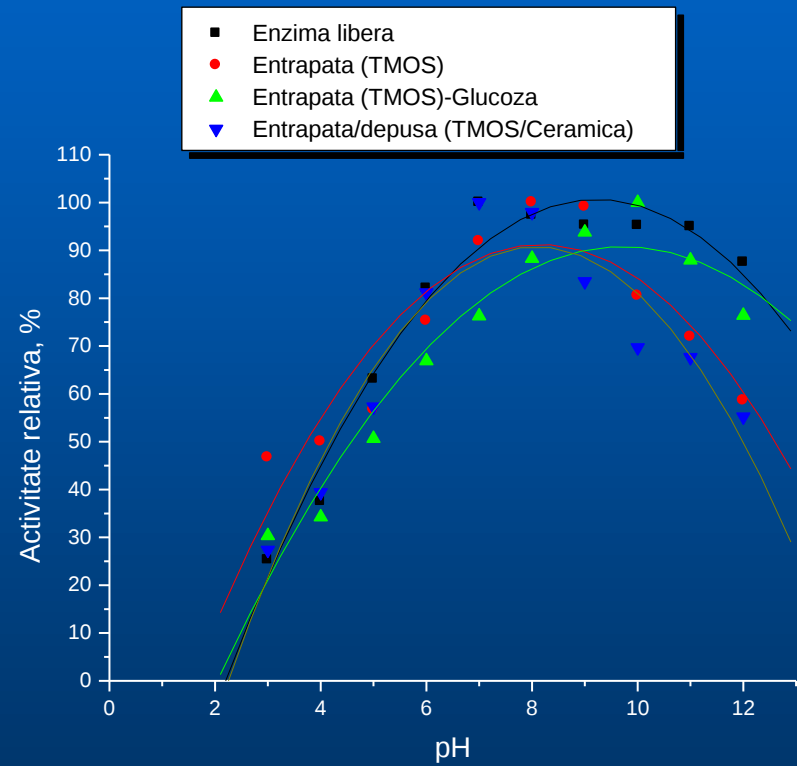
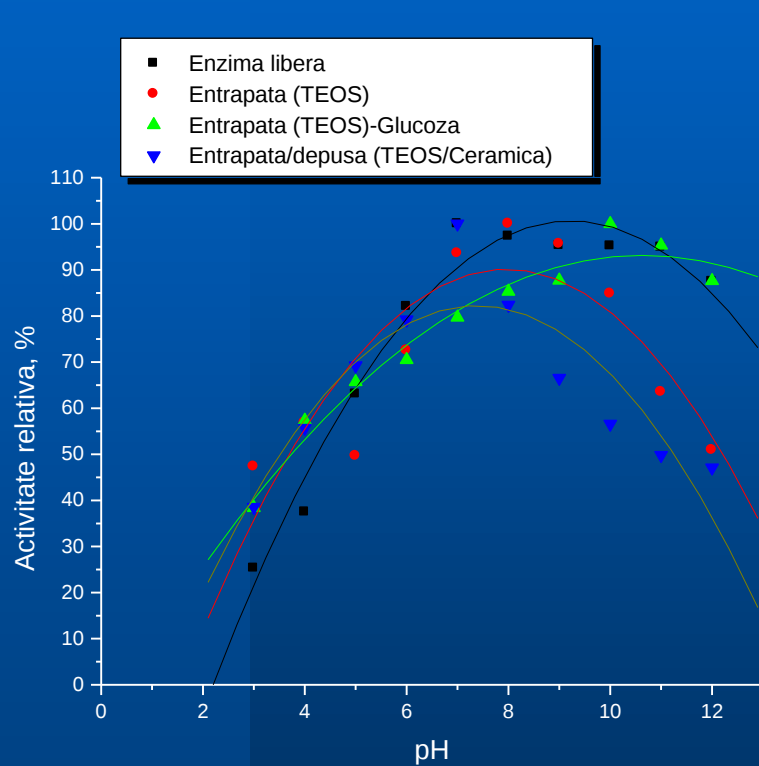
Randamentul de imobilizare = $A_f \cdot 100 / A_i$, unde A_i este activitatea totală inițială iar A_f este activitatea totală din solidele uscate.

PLAN DE REALIZARE A PROIECTULUI 2008

Obiective	Activități	Rezultate livrate pe etapă
2. Caracterizarea preparatelor proteazice libere si stabilizate	2.1. Determinarea si compararea activitatilor proteolitice a preparatelor stabilizate prin legare fizica, entrapare si entrapare depunere.	Buletin de analiza
	2.2. Caracterizarea fizico-chimica si biochimica a imobilizatorilor biologice (caracteristici structurale, parametri optimi de actiune (pH, temperatura, efectori)).	Parametri de functionare Buletin de analiza
	2.3. Studiul cinetic pe substrat model, cu determinarea parametrilor cinetici.	Parametri de functionare Buletin de analiza

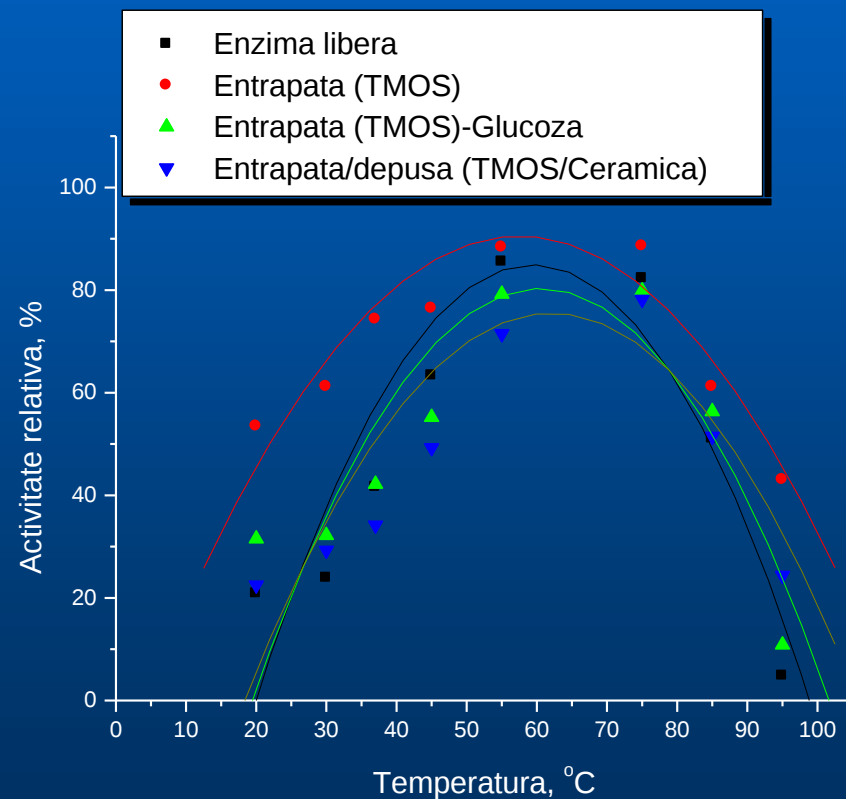
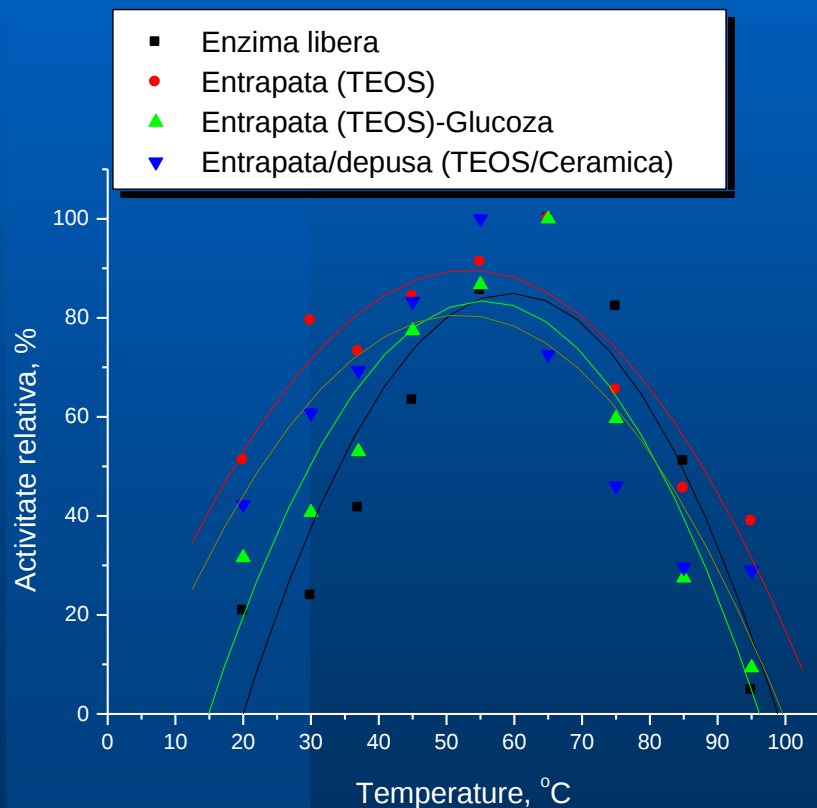
Realizare obiectiv 2/2008

Caracterizarea preparatelor proteazice libere și stabilizate

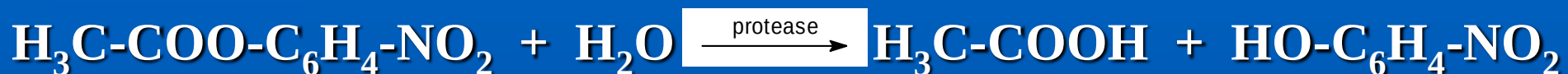


Influența pH-ului asupra activității proteolitice a preparatului enzimatic liber și imobilizat

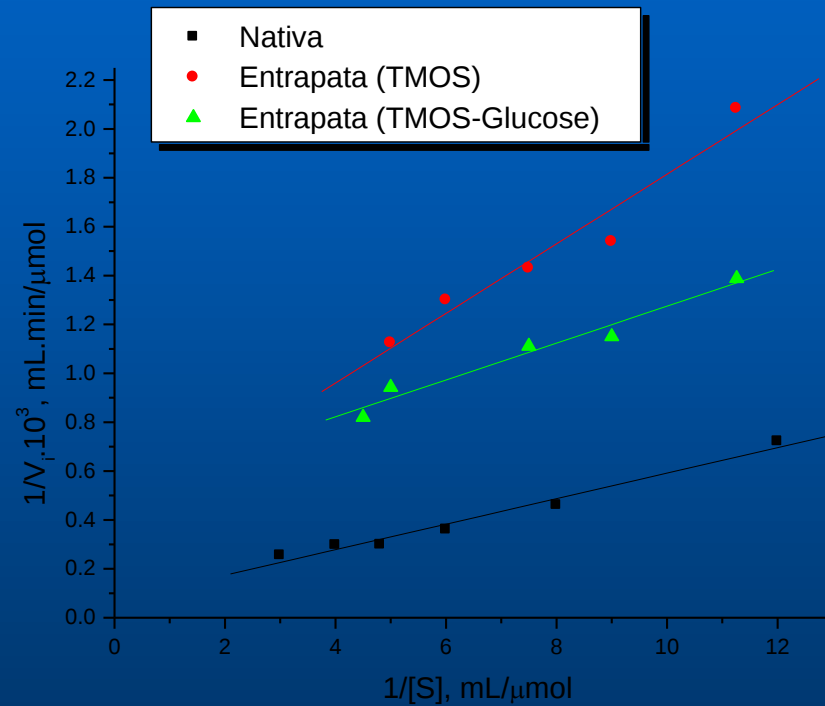
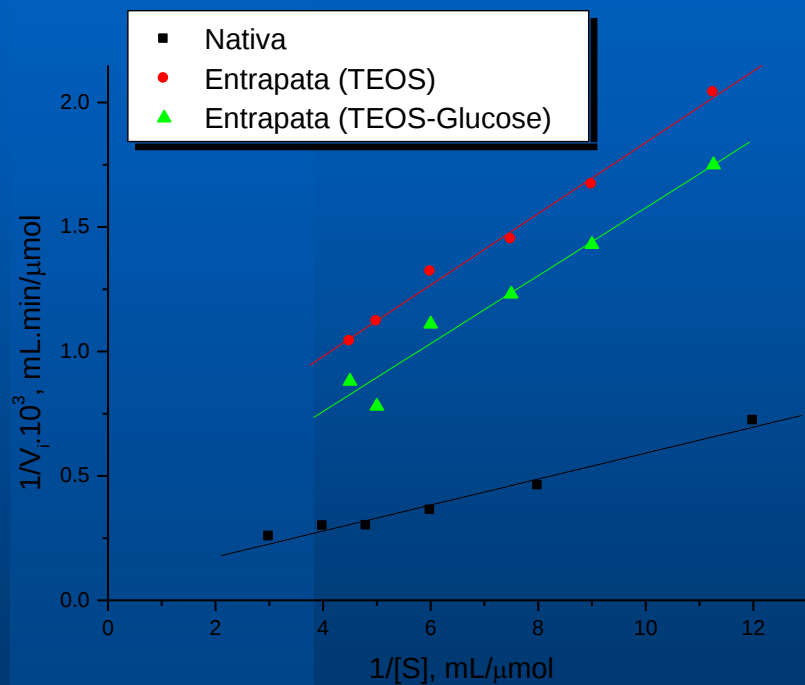
Profilul de temperatură al activității proteolitice a preparatului enzimatic liber și imobilizat



Studiul cinetic pe substrat model (acetat de para nitrofenil)



Constante cinetice		K_M $\mu\text{mol.mL}^{-1}$	$V_{\max} \cdot 10^3$ $\mu\text{mol.mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$V_{\max} \cdot 10^3 / K_M$ min^{-1}
Nativa	Michaelis-Menten	0.33	7.99	24.21
Entrapata (TEOS)	Michaelis-Menten	0.37	2.54	6.86
Entrapata (TEOS-glucose)	Michaelis-Menten	0.39	3.09	7.92
Entrapata (TMOS)	Michaelis-Menten	0.27	2.07	7.67
Entrapata (TMOS-glucose)	Michaelis-Menten	0.15	1.97	13.13



Liniazarea Lineweaver-Burke

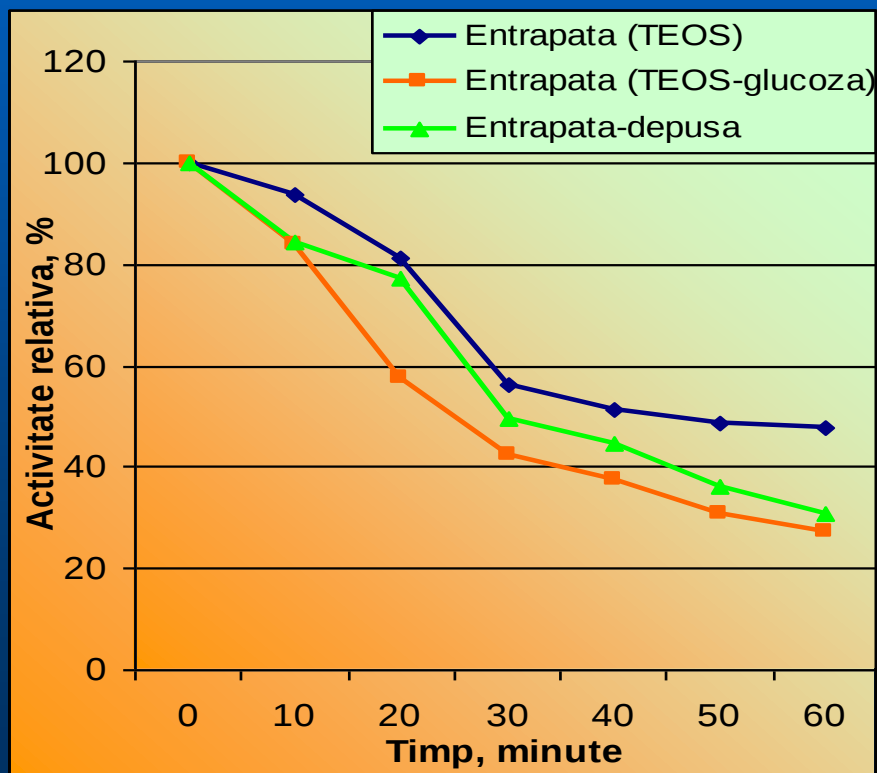
PLAN DE REALIZARE A PROIECTULUI 2008

Obiective	Activități	Rezultate livrate pe etapă
3. Studiul comparativ al stabilitatii proteazelor libere si imobilizate	3.1. Studiul stabilitatii imobilizatelor la temperatura si pH.	Parametri de functionare
	3.2. Studiul stabilitatii in timp a preparatelor proteolitice imobilizate.	Parametri de functionare

Realizare obiectiv 3/2008

Stabilitatea preparatelor enzimatiche imobilizate

Stabilitatea la pH 3 și temperatura de 37°C



Stabilitatea în timp a preparatelor enzimaticice imobilizate

Metoda de imobilizare	Activitate relativa %			
	Initial	O luna	Doua luni	Patru luni
Entrapare (TEOS)	100.00	67.10	63.25	51.54
Entrapare (TEOS - glucoza)	100.00	63.63	59.44	48.06
Entrapare/depunere (TEOS/ceramica)	100.00	50.22	45.54	32.22
Entrapare (TMOS)	100.00	78.17	69.87	52.74
Entrapare (TMOS - glucoza)	100.00	74.82	66.66	49.23
Entrapare/depunere (TMOS/ceramica)	100.00	38.44	10.28	-

Parametri de funcționare

Precursor TEOS

Preparat enzimatic stabilizat prin entrapare

- În absența glucozei

- $pH_{optim} = 8$
- $t_{optim} = 65^{\circ}C$
- stabilitate operațională, 1h, pH 3, $t\ 37^{\circ}C = 47.90\%$ activitate remanentă
- stabilitate în timp = 51,54% activitate remanentă după 4 luni păstrare la $4^{\circ}C$

- În prezența glucozei

- $pH_{optim} = 10$
- $t_{optim} = 65^{\circ}C$
- stabilitate operațională, 1h, pH 3, $t\ 37^{\circ}C = 27,12\%$ activitate remanentă
- stabilitate în timp = 48,06% activitate remanentă după 4 luni păstrare la $4^{\circ}C$

Preparat enzimatic stabilizat prin entrapare-depunere

- $pH_{optim} = 7$
- $t_{optim} = 55^{\circ}C$
- stabilitate operațională, 1h, pH 3, $t\ 37^{\circ}C = 30,95\%$ activitate remanentă
- stabilitate în timp = 32,22% activitate remanentă după 4 luni păstrare la $4^{\circ}C$

Parametri de funcționare

Precursor TMOS

1. Preparat enzimatic stabilizat prin entrapare

În absența glucozei

- $pH_{optim} = 8$
- $t_{optim} = 65^{\circ}C$
- **stabilitate în timp** = 52,74% activitate remanentă după 4 luni păstrare la $4^{\circ}C$

În prezența glucozei

- $pH_{optim} = 10$
- $t_{optim} = 65^{\circ}C$
- **stabilitate în timp** = 49,23% activitate remanentă după 4 luni păstrare la $4^{\circ}C$

2. Preparat enzimatic stabilizat prin entrapare-depunere

- $pH_{optim} = 7$
- $t_{optim} = 65^{\circ}C$
- **stabilitate în timp** = 0% activitate remanentă după 4 luni păstrare la $4^{\circ}C$

PLAN DE REALIZARE A PROIECTULUI

2009

Obiective	Activități	Rezultate livrate pe etapă
1. Obținerea preparatelor enzimaticе cu activitate amilolitică stabilizate prin legare fizică, entrapare în gel de silice și entrapare – depunere pe suport anorganic	1.1. Testarea tulpinilor microbiene din punct de vedere al activității amilolitice prin realizarea de culturi la nivel de laborator.	Parametri de funcționare Metoda de laborator Schema tehnologică
	1.2. Optimizarea procesului de imobilizare a amilazelor prin legare fizică, entrapare și entrapare-depunere, bazat pe cele mai bune rezultate obținute la imobilizarea proteazelor.	Parametri de funcționare Metoda de laborator Schema tehnologică

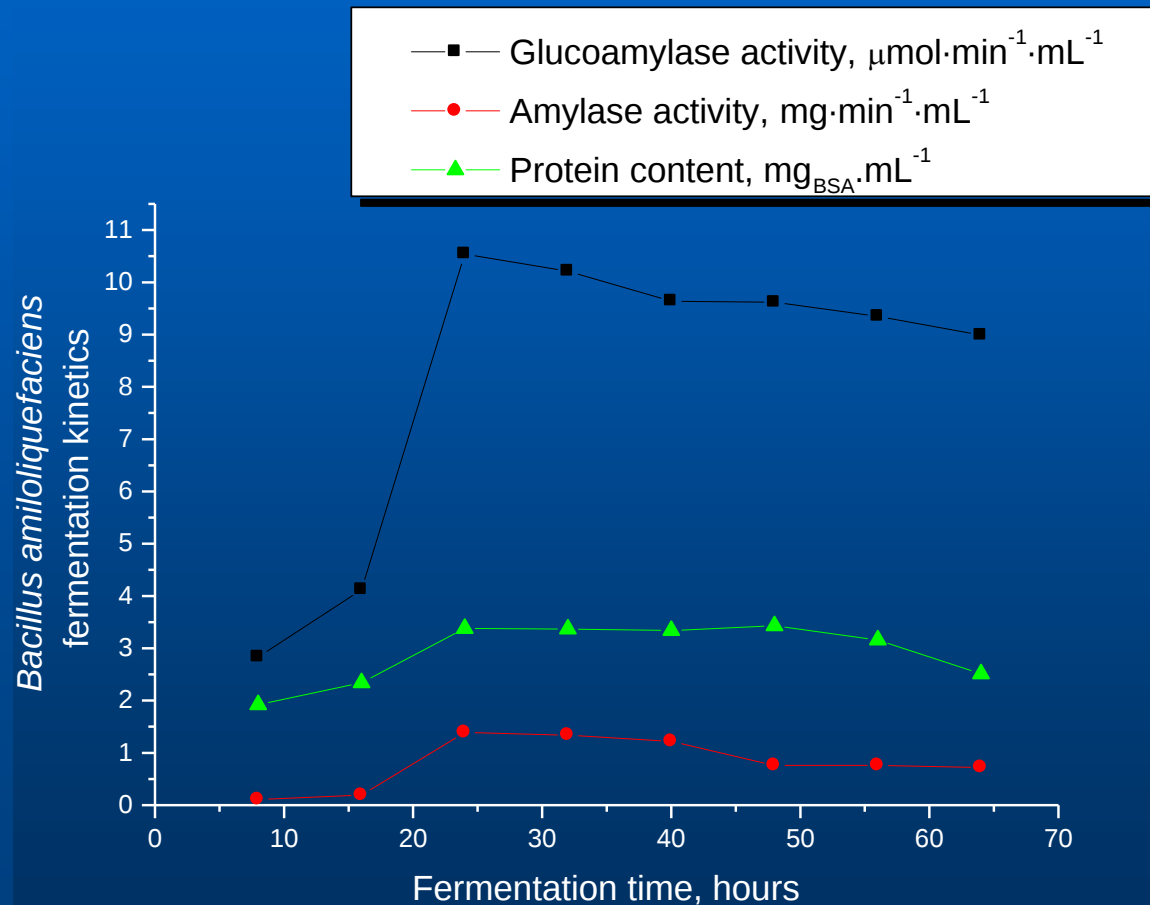
Testarea unor tulpini de *Bacillus* producătoare de amilaze

Tulpina bacteriana	pH	Durata de fermentatie h	Activitate amilazica $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$	Continut proteine $\text{mg}_{\text{BSA}}\cdot\text{mL}^{-1}$
<i>Bacillus subtilis</i> 222	8	72	0.92	1.89
<i>Bacillus subtilis</i> SML amy+	8	72	0.94	2.28
<i>Bacillus subtilis</i> 3218	8	72	2.03	2.34
<i>Bacillus globigi</i> CMIT 1.44	8	72	2.36	2.46
<i>Bacillus amiloliquefaciens</i> DSM 7	8	24	10.54	3.38

Testarea unor medii de cultura

<i>Medii de cultura</i>	Durata de fermentatie h	Activitatea amilazica $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$	Continut in proteine $\text{mg}_{\text{BSA}}\cdot\text{mL}^{-1}$
I (amidon 2%)	72	5.54	1.85
II (amidon 1%)	72	2.86	7.32
III (srot de soia, faina de porumb)	48	5.98	2.50
IV (faina de porumb)	24	10.54	3.38

Dinamica fermentatiei celulelor de *Bacillus amiloliquefaciens* - mediu de cultura IV

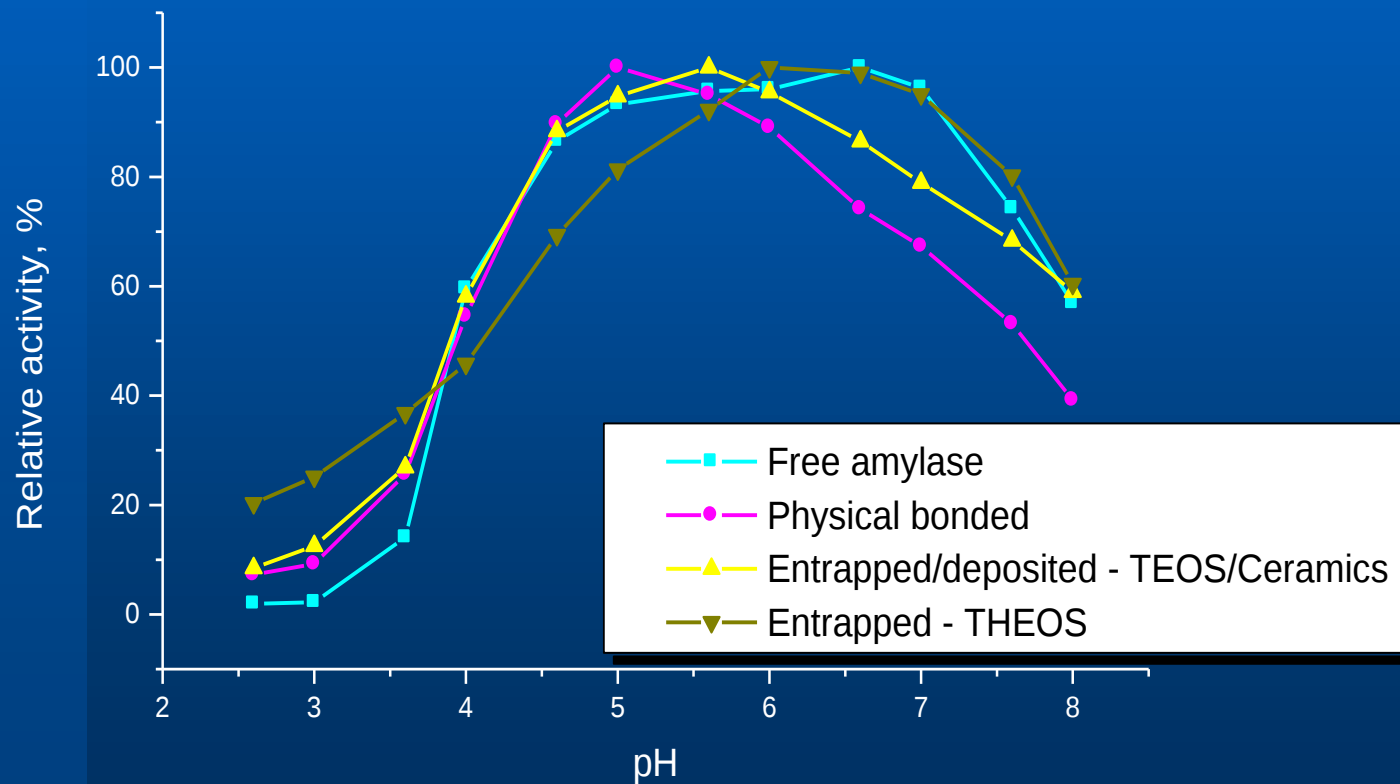


Conținutul în proteine si activitatea amilolitică a preparatului enzimatic imobilizat

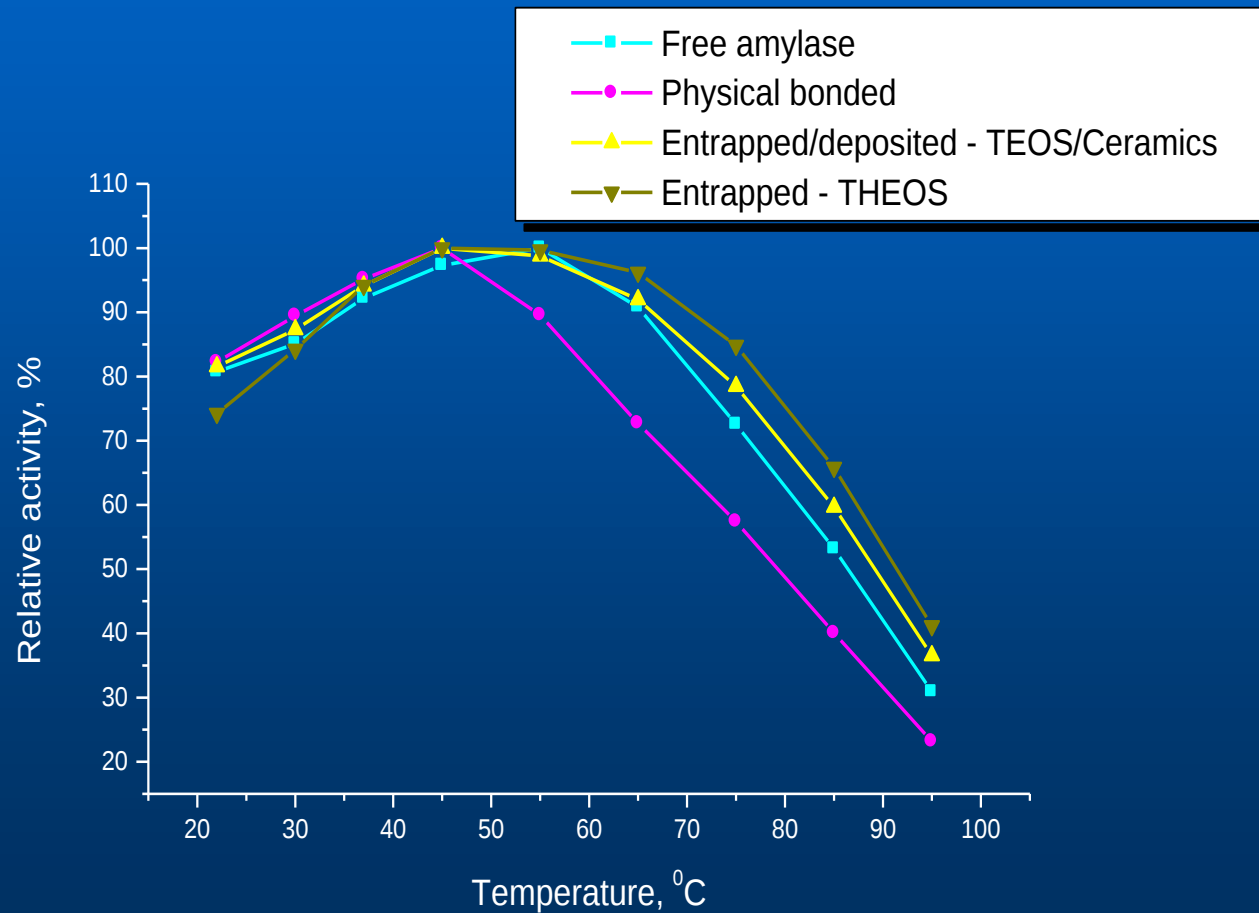
Amilaza de <i>B. amyloliquefaciens</i>			Continut in proteine $\text{mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{mL}^{-1}$ $\text{mg}_{\text{BSA}} \cdot \text{g}^{-1}$	Activitate amilazica $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	Randament de imobilizare ^a %
Preparat enzimatic liber	Mediu de cultura ^b		3.38	10.54	-
	Enzima liofilizata ^c		278.36	1196.00	-
Preparat enzimatic imobilizat ^c	Adsorbție fizică		1.70	5.92	38.52
	Entrapare	TMOS	3.29	0.20	2.73
		TEOS	4.35	0.25	3.46
		THEOS	3.56	7.34	45.08
		TBOS	3.78	0.21	2.91
	Entrapare/Depunere (TEOS/Ceramica)		2.21	4.80	19.16

^aRandamentul de imobilizare = $A_i \cdot 100 / A_f$, unde A_i este activitatea totală inițială iar A_f este activitatea totală din solidele uscate, ^blichid, ^csolid

Influența pH-ului asupra activității amilolitice a preparatului enzimatic liber și imobilizat

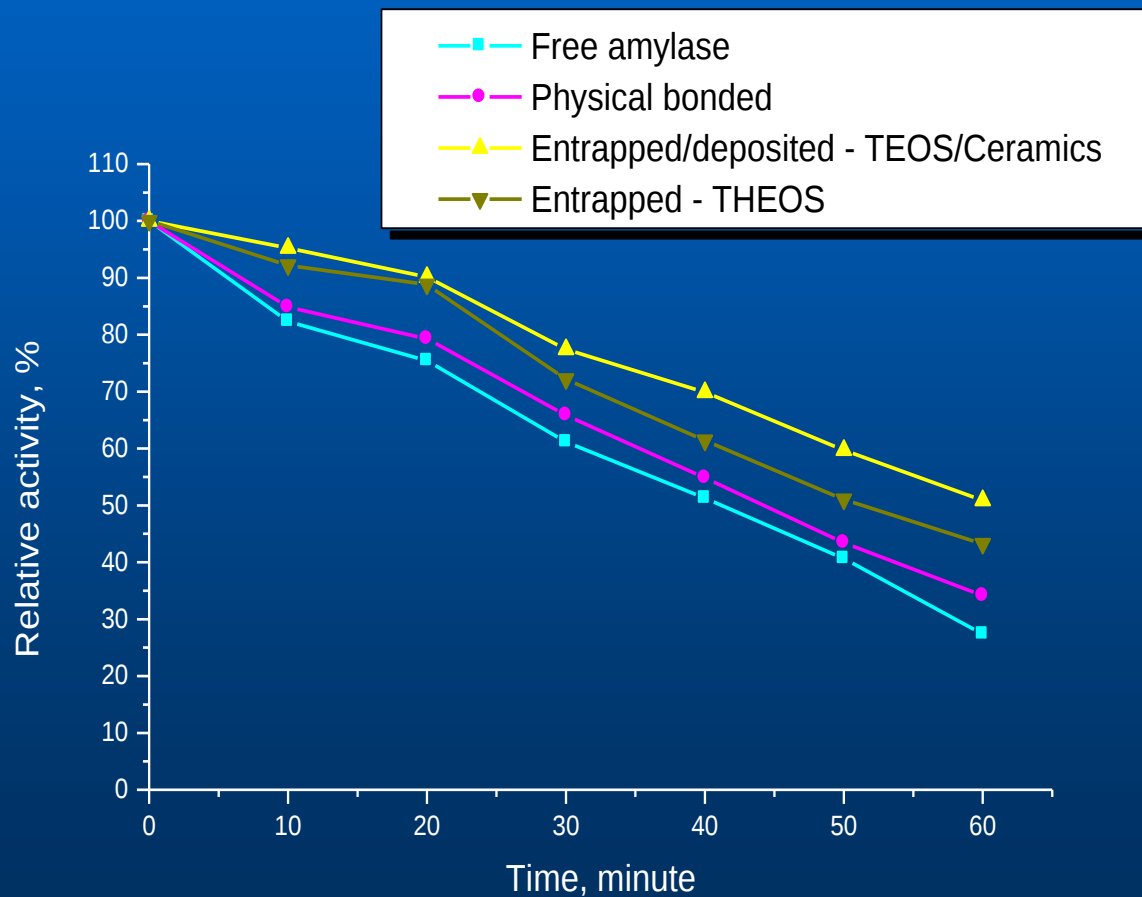


Profilul de temperatură al activității amilolitice a preparatului enzimatic liber și imobilizat



Stabilitatea preparatelor enzimaticice imobilizate

Stabilitatea la pH 3 și temperatura de 37°C



PLAN DE REALIZARE A PROIECTULUI

2009

Obiective	Activități	Rezultate livrate pe etapă
2. Obținerea preparatelor enzimaticice cu activitate celulozolitica stabilizate prin legare fizica, entrapare in gel de silice si entrapare – depunere pe suport anorganic	2.1. Testarea tulpinilor microbiene din punct de vedere al activitatii celulozolitice prin realizarea de culturi la nivel de laborator.	Parametri de functionare Metoda de laborator Schema tehnologica
	2.2. Optimizarea procesului de imobilizare a celulelor prin legare fizica, entrapare si entrapare-depunere, bazat pe cele mai bune rezultate obtinute la imobilizarea proteazelor.	Parametri de functionare Metoda de laborator Schema tehnologica

PLAN DE REALIZARE A PROIECTULUI

2009

Obiective	Activități	Rezultate livrate pe etapă
3. Caracterizarea preparatelor enzimaticice libere si stabilizate	3.1. Determinarea si comparare activitatilor amilolitice si celulozolitice a preparatelor imobilizate prin legare fizica, entrapare si entrapare depunere.	Parametri de functionare Buletin de analiza
	3.2. Caracterizarea preparatelor imobilizate (caracteristici structurale, parametri optimi de actiune). Determinarea stabilitatii acestora.	Parametri de functionare Buletin de analiza

Concluzii

- Tehnologia sol-gel (precursori alcoxisilani):
 - geluri de silice biocompatibile
 - legătura dintre lumea vie și nevie
 - imobilizarea diferitelor biospecii active
- Enzimele entrapate în matrici sol-gel rămân biocatalitic active
- Creșterea stabilității enzimatică la variația factorilor de mediu
- Atât preparatul enzimatic nativ cât și cel imobilizat urmează o cinetica Michaelis – Menten
- Viteza de reacție este influențată de limitările difuzionale impuse de matricea de silice
- Matricile compozite obținute din precursori alcoxisilanici reprezintă gazde bune pentru imobilizarea biomoleculelor și utilizarea lor ulterioară în biotransformări

Criterii minime de performanță așteptate

An	Număr de articole acceptate spre publicare în reviste indexate ISI	Număr de articole acceptate spre publicare în reviste indexate în baze de date internaționale	Număr cereri de brevete naționale depuse	Număr cereri de brevete internaționale depuse
2007	0	0	0	0
2008	0	1	0	0
2009	1	1	0	0
2010	1	1	0	0
TOTAL	2	3	0	0

Lucrari stiintifice publicate pe tematica proiectului

Stabilization of microbial enzymatic preparations used in feed industry, Dragomirescu Monica, Vintilă T., Vintila Daniela, Preda Gabriela, *Lucrări Științifice Zootehnie și Biotehnologii*, vol. 41, 69, 2008

Microbial enzymatic preparations entrapped in silica gels, Dragomirescu Monica, Vintilă T., Vlad-Oros Beatrice, Preda Gabriela, *International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, Timisoara, 28-30 Mai 2008

Entrapment of microbial proteases in hybrid organic-inorganic silica-gels, Dragomirescu Monica, Vintilă T., Preda Gabriela, *INTERNATIONAL CONGRESS ON BIOCATALYSIS*, Hamburg August 31 - September 4, 275, 2008

Sol-Gel Entrapment of *Bacillus licheniformis* CMIT 1.33

Proteases, Dragomirescu Monica, Vintilă T., Preda Gabriela,
International Enzyme Engineering Symposium IEES'08 Kusadasi,
Turkiye, 1-5 october, 89, 2008

Silica Gels as Hosts for Microbial Cells, Dragomirescu Monica,
Vintilă T., Preda Gabriela, *International Enzyme Engineering
Symposium IEES'08 Kusadasi*, Turkiye, 1-5 october, 84, 2008

Enzyme sintetizate de celule bacteriene imobilizate prin tehnica sol-gel, Dragomirescu Monica, Vintilă T., Preda Gabriela, A XXX-a
Conferință Națională de Chimie, 5-7 oct. 2008, Călimănești-
Căciulata, România

Microbial hydrolases immobilized on porous matrices,
Dragomirescu Monica, Vintilă T., Vintila Daniela, Preda
Gabriela, *Lucrări Științifice Zootehnie si Biotehnologii*, vol. 42,
2009

**Microbial enzymatic preparation with protease activity
stabilized by entrapment in silica gels,** Preda Gabriela,
Dragomirescu Monica, *8th International Conference on Protein
Stabilisation – ProStab2009*, 11-14 aprilie Gratz 2009

Lucrari stiintifice in curs de publicare pe tematica proiectului

Sol-gel Entrapment of Microbial Proteases in Silica-Gels, Dragomirescu Monica, Preda Gabriela, Vintilă T., Roum. Biotechnol. Lett., (ISI) 2009

Synthesis and properties of different sol-gel matrices containing bacterial α -amylase, Vlad-Oros Beatrice, Dudas Z, Preda Gabriela, Dragomirescu Monica, Chiriac A., Rev. Chim. (Buc) (ISI), 7/2009

Activity and stability of starch converting enzymes entrapped in silica gels, Dragomirescu Monica, Vintilă T., Vintila Daniela, Preda Gabriela, *Ann. West Univ. Timișoara*, (B+) 2009

Microbial Amylases Immobilized in Silica Gels,
Dragomirescu Monica, Vintilă T., Preda Gabriela, BIOTRANS
2009, 5-9 iulie Berna

**Entrapment of Microbial Cells in Sol-Gel Derived Silica
Matrixes,** Dragomirescu Monica, Vintilă T., Preda Gabriela,
BIOTRANS 2009, 5-9 iulie Berna

Implicarea tinerilor cercetatori 2007

Nr. crt.	Structura personalului	Valoare salariu brut (inclusiv ch. angajator) -lei-	Nr. de persoane	Nr. ore lucrate	Echivalent norma intreaga
1	Cercetatori cu experienta	10.974	3	155	0.46
2	Cercetatori in formare	1.026	1	23	0.07
	TOTAL	12000	4	178	0.53

Implicarea tinerilor cercetatori 2008

Nr. crt.	Structura personalului	Valoare salariu brut (inclusiv ch. angajator) -lei-	Nr. de persoane	Nr. ore lucrate	Echivalent norma intreaga
1	Cercetatori cu experienta	42.263	3	610	0.45
2	Cercetatori in formare	7.737	1	176	0.13
	TOTAL	50.000	4	786	0.58

Activitati in care au fost implicati tinerii cercetatori

- Realizare fermentatii microbiene (proteaze, amilaze)
 - Preparare medii de cultura
 - Urmarire cultura in timpul fermentatiei
 - Urmarire pH
 - Determinarea activitatii enzimaticice
 - Determinarea continutului in proteine
- Imobilizarea prin adsorbtie fizica, entrapare si entrapare-depunere a preparatelor enzimaticice
- Caracterizarea preparatelor enzimaticice stabilizate

😊 **Sustinerea tezei de doctorat in sedinta publica (aprilie 2009)**

Dificultati intampinate in derularea proiectului

- Sensibilitatea mai mare a amilazelor comparativ cu cea a proteazelor in tehnologia de entrapare prin metoda sol-gel → utilizarea unui alt precursor (THEOS) pentru obtinerea de rezultate competitive
- Necesitatea concentrarii enzimei din mediul de cultura – liofilizare
- Sumele mari de bani ce trebuiesc sustinute de Universitate pana la decontare fac ca aceasta sa fie in pericol de incapacitate de plata

Vă multumesc

