

CAPITOLUL 1

BIOTEHNOLOGIILE: ISTORIC. PROCESE ȘI PRODUSE BIOTEHNOLOGICE

1.1 Definiția biotehnologiei; evoluția în timp a biotehnologiei ca știință tehnică

Descoperirile spectaculoase din domeniile biologiei, biochimiei, microbiologiei, geneticii, enzimologiei, precum și necesitatea aplicării acestor cunoștințe în practică au condus la apariția unei noi științe denumită generic “biotehnologie”. Caracterul interdisciplinar al biotehnologiei a creat încă de la început probleme privind definirea și localizarea ei ca știință de sine stătătoare.

Dintre toate definițiile aceea dată biotehnologiei de către Federația Europeană de Biologie (1978), pare a fi satisfăcătoare: ***"Utilizarea integrată a biochimiei, microbiologiei și ingineriei în scopul obținerii unei aplicații tehnologice (industriale), cu ajutorul microorganismelor, culturilor de celule și a părților componente a acestora"***. Simplificând, se poate spune că biotehnologia presupune ***"utilizarea organismelor sau a produselor derivate de la acestea în scopuri comerciale."***

În esență, principalul scop al biotehnologiei este obținerea de produse sau servicii utile activității umane, cu ajutorul organismelor vii. Procesul de bază în biotehnologie este “proces biologic”, după cum procesul de bază în tehnologia chimică este “procesul chimic”. În tabelul 1.1 poate fi urmărită natura produselor comerciale obținute pe cale biotehnologică utilizând diferite tipuri de celule.

Produse majore obținute pe cale biotehnologică

Tabelul 1.1

Produse de fermentație	Tipul de organism utilizat	Producție anuală(în lume)kg/an
Solvenți organici Etanol(nu pentru băuturi) Acetonă/butanol	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i>	$2 \cdot 10^{10}$ $2 \cdot 10^6$
Biomasă Culturi starter și drojdii pentru industria alimentară și agricultură Proteine monocelulare	Bacterii lactice sau drojdii de panificație <i>Pseudomonas methylotrophus</i> sau <i>Candida utilis</i>	$5 \cdot 10^8$ $0.5-1 \cdot 10^8$
Acizi organici Acid citric Acid gluconic Acid lactic Acid itaconic	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Aspergillus itaconicus</i>	$2-3 \cdot 10^8$ $5 \cdot 10^7$ $2 \cdot 10^7$

Aminoacizi		
Acid L-Glutamic	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	$3 \cdot 10^8$
L-Lysină	<i>Brevibacterium flavum</i>	$3 \cdot 10^7$
L-Fenilalanină	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	$2 \cdot 10^6$
L-Arginină	<i>Brevibacterium flavum</i>	$2 \cdot 10^6$
Alți aminoacizi	<i>Corynebacterium spp.</i>	$1 \cdot 10^6$
Transformări microbiene		
Steroizi	<i>Rhizopus arrhizus</i>	
D-Sorbitol la L-sorboză (în producția de vitamina C)	<i>Acetobacter suboxydans</i>	$4 \cdot 10^7$
Polizaharide extracelulare		
Xanthan	<i>Xanthomonas campestris</i>	$5 \cdot 10^6$
Dextran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
Nucleotide		
5'-Guanosin monofosfat	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	$1 \cdot 10^5$
Enzime		
Proteaze	<i>Bacillus spp.</i>	$6 \cdot 10^5$
α -Amilaze	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	$4 \cdot 10^5$
Glucoamilaze	<i>Aspergillus niger</i>	$4 \cdot 10^5$
Glucozizomerază	<i>Bacillus coagulans</i>	$1 \cdot 10^5$
Pectinaze	<i>Aspergillus niger</i>	$1 \cdot 10^4$
Renina	<i>Mucor miehei</i> sau drojdii recombinanta	$1 \cdot 10^4$
Vitamine		
B ₁₂	<i>Propionibacterium shermanii</i>	$1 \cdot 10^4$
Ribovlavina	<i>Eremothecium ashbyii</i>	
Alcaloide Ergot	<i>Claviceps paspali</i>	$5 \cdot 10^3$
Pigmenți		
β -Carotene	<i>Blakeslea trispora</i>	60
Vaccinuri împotriva:		
-difteriei	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<50
-tetanosului	<i>Clostridium tetani</i>	
-pertussisului (tusea convulsivă)	<i>Bordetella pertussis</i>	
-virusului poliomielitei	Virusuri active atenuate cultivate <i>in vitro</i>	
-rubeolei, etc		
Proteine terapeutice		
Insulina; Hormonul uman de creștere Eritropoietina; Factorul VIII-C; Interferonul- α_2 , etc	Bacterii, drojdii sau cellule mamaliene recombinante	<20
Insecticide		
Spori bacterieni	<i>Bacillus thuringiensis</i>	

Spori de fungi	<i>Hirsutella Thompsonii</i>	
Antibiotice		
Peniciline	<i>Penicillium chrysogenum</i>	$3\cdot 4\cdot 10^7$
Cefalosporine	<i>Cephalosporium acremonium</i>	$1\cdot 10^7$
Tetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	$1\cdot 10^7$
Antibiotice macrolide	<i>Streptomyces erythreus</i>	
Antibiotice polipeptide	<i>Bacillus brevis</i>	$2\cdot 10^6$
Antibiotice aminoglicoside	<i>Streptomyces griseus</i>	
Antibiotice aromatice	<i>Penicillium griseofulvum</i>	$1\cdot 10^6$
Anticorpi monoclonali	Celule de tip Hybridoma	<20

1.2. Dezvoltarea industriei biotehnologice; rolul cercetării fundamentale în biotehnologie

Cunoașterea științifică și strategia de dezvoltare economică actuală se bazează pe o nouă abordare a fenomenelor, acestea conducând la o adevărată revoluție biotehnologică. Se apreciază că în viitor cea mai mare parte a industriei se va baza pe procedee de fermentație, inginerie biochimică, biologie moleculară, aceasta din urmă imprimând un salt tehnologic corespunzător. Pe aceste baze, industria biotehnologică va lua un avânt considerabil. Ingineria genetică este considerată a fi tehnica ideală capabilă să amelioreze cantitativ și calitativ capacitatea de biosinteză a celulelor de microorganisme, animale sau vegetale, în scopul obținerii unor produse utile. Natura interdisciplinară a biotehnologiei este evidentă dacă se ține seama de etapele unui proces biotehnologic complet. Dacă se ia ca exemplu obținerea unui produs nou prin tehnologia ADN-recombinant, cum ar fi insulina, hormonul de creștere sau interferonul, atunci de la idee până la obținerea unui produs comercial se parcurg o serie întreagă de faze care implică cunoștințe aparținând unor domenii științifice foarte diferite.

Prima treaptă de dezvoltare a bioprocesului se referă la manipularea genetică a organismului gazdă; în acest caz, gena de interes este clonată într-o gazdă specifică (de ex. *Escherichia coli*) și se stabilesc o serie de parametri, cum ar fi stabilitatea tulpinii recombinante și nivelul de expresie al produsului dorit. După clonare, caracteristicile de creștere și producție a celulelor trebuie măsurate în funcție de condițiile de cultivare, ceea ce necesită aplicarea tehnicilor de cultivare obișnuite în microbiologie în vederea stabilirii parametrilor optimi: compoziția mediului, pH, temperatură, concentrație de oxigen dizolvat astfel încât productivitatea în produsul urmărit să fie maximă. Se pornește prin cultivarea microorganismului la scara mică, în flacoane agitate de 250 ml până la un litru capacitate. Performanțele organismului sunt descrise prin calcularea ratei de creștere, productivitatea specifică, randamentul în produs finit.

După cunoașterea condițiilor de cultivare în laborator se pornește procesul de ridicare la scară pilot și industrial.

1. Prima treaptă poate fi un *bioreactor* de 1, 2 sau 5 l echipat cu instrumente de măsură și control al temperaturii, pH, concentrație oxigen dizolvat, viteză de agitare. Culturile pot fi monitorizate mai bine în bioreactor decât în flacoane agitate. Se pot culege mult

mai multe informații referitoare la necesarul de oxigen al microorganismului sau la caracteristicile de spumare ale mediului sau alți parametri. De asemenea pot fi identificate limitările impuse de tipul bioreactorului. De exemplu, dacă acesta nu poate asigura necesarul de oxigen, celulele sunt înfometate. În mod similar, dacă agitarea mediului de cultură nu este adecvată, aceasta poate conduce la spargerea celulelor și devierea procesului de cultivare. În bioreactor se stabilesc condițiile pentru o anumită activitate a celulelor. În această fază se calculează diferiți parametri cum ar fi: coeficienții de transfer de masă, timpul de agitare, viteza de dizolvare a oxigenului, puterea de agitare și mulți alții. Aici se decide dacă cultura de celule poate fi operată cel mai bine în sistem "batch", semi-continuu sau continuu. De asemenea pot fi încercate diferite tipuri de bioreactor. Se realizează de asemenea un calcul economic de fezabilitate.

2. Următoarea treaptă de *ridicare la scară* este aceea de *bioreactor pilot*. În această fază se implică specialistii instruiți în ingineria bioproceselor și în ridicarea la scară industrială a acestora. În prezent se construiesc vase de 100-1000 l după specificațiile prototipului de laborator. Scopul fazei pilot este acela de a examina răspunsul celulelor cultivate la o scară mai mare. În această treaptă de operare, rezultatele pot fi mai bune sau mai scăzute față de cele obținute în bioreactorul laborator. În funcție de aceste rezultate se hotărăște dacă se trece la producția industrială sau nu. Această parte a procesului tehnologic aparține în întregime ingineriei bioproceselor: se proiectează atât bioreactorul industrial cât și facilitățile auxiliare: echipamente de sterilizare aer și mediu, generator de abur, utilaje necesare preparării mediilor de cultură, sistem de apă de racire, aparatura de automatizare și control. O importanță deosebită se acorda faptului ca instalația trebuie să asigure condiții aseptice pe întreg fluxul de producție.
3. O parte importantă a unui proces biotehnologic o constituie faza de recuperare a produsului din mediul de producție și anume izolarea și purificarea acestuia până la produsul finit. Această fază este adesea foarte dificilă pentru produsele rezultate prin tehnologia ADN recombinant, astfel încât costurile reprezintă 80-90% din costul total al bioprocesului. Procedeele aplicate pentru izolare și purificare depinde de natura produsului și cuprinde metode fizice, chimice, biologice. Multe metode încercate în laborator și care au dat rezultate bune, nu pot fi aplicate la scara industrială. În această fază, biochimistii, inginerii chimiști, tehnologii au o contribuție importantă în recuperarea și purificarea substanței active. Procedeele elaborate includ: filtrări, centrifugări pentru separarea celulelor de lichid, metode mecanice de distrugere a membranei celulare, dacă produsul este intracelular, extracții cu solvenți, metode cromatografice, separări prin membrane, cristalizări și uscări. Toate aceste procedee sunt testate mai întâi la scara mică și apoi la scară pilot și industrial.

Dupa ce produsul a fost purificat până la standardele cerute de normele internaționale, acesta poate fi ambalat și vândut. În cazul produselor farmaceutice noi este necesară și testarea eficacității acestora, mai întâi pe animale și apoi pe oameni. Pentru produsele uz alimentar sunt cerute alte teste specifice.

Pentru toate produsele obținute pe cale biotehnologică se cer avize oficiale conforme cu standardele existente pentru fiecare tip de produs. Din acest exemplu se poate vedea că într-un bioproces sunt implicate multe discipline diferite atât tehnice cât și discipline fundamentale. Specialiștii din domeniul biotehnologiei se confruntă în mod constant cu probleme aparținând domeniilor: biologie, chimie, fizică, inginerie și uneori medicină.

1.3. Aplicații ale biotehnologiei în medicină, agricultură, industria alimentară, industria farmaceutică

Sfera domeniilor de aplicabilitate a biotehnologiilor este foarte mare, dată fiind varietatea proceselor biotehnologice.

Principalele direcții de dezvoltare a biotehnologiilor moderne sunt determinate în primul rând de descoperirile recente din domeniul biologiei moleculare dar și de cerințele societății față de anumite aspecte cu care se confruntă în prezent: criza energetică, epuizarea rezervelor de hrană de pe planetă, probleme ecologice și de bioremediere.

Încercând o *clasificare a diferitelor tipuri de biotehnologii*, în funcție de domeniul în care se aplică sau tipul de celule utilizate, observăm că este greu să realizăm o delimitare. Orice manipulare a viului în folosul societății, înseamnă biotehnologie. Indiferent dacă aceasta se realizează la nivel laborator având un caracter de cercetare fundamentală sau se realizează la nivel industrial având un caracter aplicativ, scopul final și în general tehnicile sunt asemănătoare și incluse în aceeași sferă largă a biotehnologiei.

1. În funcție de tipul de celule cu care se lucrează, deosebim: biotehnologii : microbiene, vegetale și animale.
2. În funcție de domeniul în care își găsesc aplicații produsele obținute pe cale biotehnologică deosebim:
 - Biotehnologii industriale (acestea cuprinzând biotehnologii farmaceutice, alimentare și biotehnologii de depoluare).
 - Biotehnologii agricole (care cuprind două mari domenii: biotehnologii vegetale și biotehnologii în zootehnie)
 - Biotehnologii medical-veterinare

Biotehnologiile industriale cuprind procedee de obtinere a unor produse de larg interes, la nivel industrial, utilizând microorganisme sau enzime. În categoria biotehnologiilor farmaceutice intră:

- producerea de biomasă proteică
- biosinteza antibioticelor
- producția de acizi organici
- producția de aminoacizi, enzime, obținerea de probiotice, hormoni, vitamine, polizaharide.

În funcție de gradul de puritate, produsele obținute pot fi utilizate atât pentru consumul uman cât și animal.

Biotehnologiile alimentare cuprind procedee industriale de prelucrare a legumelor și fructelor, a laptelui și produselor lactate, a cărnii, vizând în general aspectele fermentative ce stau la baza obținerii acestora.

În cadrul *biotehnologiilor de depoluare a mediului* sunt incluse toate metodele și tehnicile de epurare biologică a apelor uzate sau poluate, a aerului sau ale solurilor degradate, extracția de minereuri cu ajutorul microorganismelor sau metodele de bioremediere cu ajutorul plantelor sau microorganismelor.

Biotehnologiile agricole vizează un domeniu larg de aplicare și presupun atât utilizarea aspectelor tradiționale de ameliorare a plantelor și animalelor cât și cele moderne, bazate pe manipularea genetică controlată a informației genetice a celulelor vegetale (biotehnologii vegetale) sau a celor animale (biotehnologii animale – cu aplicații în zootehnie sau medical veterinar). Biotehnologiile vegetale vizează utilizarea culturilor celulare vegetale precum și a tehnicilor de inginerie genetică în scopul obținerii de noi soiuri cu rezistență la atacul agenților patogeni, tolerante/rezistente la factori de mediu defavorabili, la implementarea de sisteme simbiotice la diferite specii de plante, multiplicarea speciilor horticole și obținerea de noi hibridi cu proprietăți îmbunătățite etc.

Biotehnologiile din domeniul zootehniei se referă în special la nutriția animală, creșterea rezistenței animalelor la atacul factorilor patogeni, biotehnici de reproducție artificială și de predeterminare a sexului la animale, conservarea resurselor genetice animale.

Biotehnologiile medical veterinare au ca scop, în principal, crearea unor sisteme de diagnostic rapid și eficient a maladiilor sau dereglărilor funcționale la animale sau la om, producerea unor sisteme biologice de combatere a bolilor (anticorpi monoclonali, vaccinuri, agenți de biocontrol), realizarea de studii în vederea clarificării mecanismelor implicate în producerea unor procese patologice sau în rezistența la diverse boli etc.

Saltul științific înregistrat în fiecare din domeniile biotehnologiei enunțate mai sus nu ar fi fost posibil fără aplicarea tehnicilor noi de biologie moleculară, legate de transferul de gene și clonarea moleculară pentru obținerea unor noi tipuri de celule și organisme; astfel este posibilă obținerea de linii celulare noi cu proprietăți utile pentru medicină, agricultură, zootehnie, industria alimentară. Incorporarea unor gene dorite, utile, conduce la obținerea unor produse noi de interes medical sau industrial.

CAPITOLUL 2

ETAPELE UNUI PROCES BIOTEHNOLOGIC

Elaborarea și industrializarea unei tehnologii de biosinteză presupune parcurgerea mai multor faze ce pornesc de la cercetările la nivel de laborator, urmate apoi de cele de la nivelul pilotului și, în final, la nivel industrial. Aceste cercetări permit transpunerea procedurii de biosinteză de la o fază la alta, cu optimizarea factorilor implicați în derularea fiecărei faze în parte.

2.1. Faza de laborator

Cercetările de obținere a unui produs prin biosinteză încep cu lucrări de laborator care constau în: izolarea și selecția organismelor (microorganismelor) de interes; întreținerea tulpinilor cu proprietățile dorite; realizarea culturilor inocul.

Izolarea și selecția unui mare număr de microorganisme cunoscute din literatura de specialitate ca producători ai compusului ce urmează a fi biosintetizat. Tehnicile utilizate în acest scop sunt specifice pentru fiecare microorganism, cele mai multe referindu-se la tehnica diluțiilor și tehnica granulelor de sol.

Microorganismele sunt preluate din diferite habitate cultivate pe medii solide sau lichide, astfel încât să fie posibilă punerea în evidență a unor caracteristici fiziologice. În prima etapă se urmărește realizarea unei culturi pure prin tehnici microbiologice specifice (epuizarea ansei, diluții succesive), după care se stabilește o metodă de triere (screening) adecvată scopului urmărit.

De obicei, microorganismele sunt cultivate pe plăci Petri, pe medii solidificate cu agar-agar. În cazul în care se urmărește selectarea unor microorganisme producătoare a unui anumit tip de enzimă se realizează teste de identificare care pot fi calitative sau cantitative. În cazul enzimelor se aplică de obicei metode de identificare calitativă prin includerea substratului specific în mediul solid pe care se cultivă microorganismele (de ex. amidon în cazul amilazelor, caseină în cazul proteazelor, celuloză în cazul celulazelor). După dezvoltarea coloniilor izolate, enzimele difuzează în gelul de agar-agar, atacând substratul inclus în mediu și astfel zona respectivă poate fi vizualizată, în cazul în care devine transparentă sau cu un reactiv specific. În cazul altor enzime la care nu se poate aplica un test calitativ, coloniile izolate se cultivă pe medii specifice după care se utilizează fie lichidul de biosinteză fie extracte din culturile respective. Produsele respective sunt prelucrate în scopul dozării cantitative prin metode spectrofotometrice, fluorescență, titrimetrice, polarimetrice. În urma acestor teste se rețin numai câteva tulpini care au dat cele mai bune rezultate în ceea ce privește biosinteza enzimei.

Întreținerea tulpinilor producătoare. După faza de izolare și selecție, tulpinile producătoare se supun unor teste de caracterizare după criterii morfologice, biochimice, fiziologice, imunologice sau toxicologice; tulpina astfel caracterizată se înregistrează într-o colecție de microorganisme, în vederea protejării sale și a utilizării ulterioare.

Tinând cont că scopul este de a obține un anumit produs la nivel industrial este necesar ca nivelul biosintezei să fie ridicat; de aceea se optimizează parametrii de biosinteză sau tulpina microbiană de interes este supusă unor teste de ameliorare prin metode clasice (mutageneză) sau moleculare (inginerie genetică).

Conservarea microorganismelor de interes, atât tulpinile parentale, cât și tulpinile modificate genetic (mutante sau recombinante) se face prin metode speciale, așa cum sunt liofilizarea și conservarea în azot lichid. Tulpinile din colecție utilizate în lucrările de biosinteză curente se păstrează sub diferite forme și formează așa numita "cultură stoc" de la care se pornește procesul de biosinteză. Cultura stoc este păstrată la frigider, pe mediu agarizat, în tuburi. Pentru prepararea unei culturi inocul de laborator, se pornește de la o astfel de cultură vegetativă.

Cultura inocul. Inoculul reprezintă o cultură microbiană în curs de multiplicare pe un substrat nutritiv corespunzător și în anumite condiții de dezvoltare (pH, temperatură, agitare, aerare) specifice. Inoculul constituie materialul de însămânțare al mediului de biosinteză propriu zis, din etapa următoare. Transferul culturii inocul în mediul de biosinteză se realizează în condiții aseptice, după o perioadă de dezvoltare bine stabilită (vârsta, cantitate, aspect microscopic).

2.2. Faza de stație pilot

Faza de biosinteză propriu-zisă se realizează în echipamente speciale, numite bioreactoare, care pot avea diferite capacități (10 l, 100 l, 1 m³, 10 m³, 100 m³), alegerea unuia sau a altuia depinzând de scopul cercetărilor.

Faza de biosinteză este precedată de operații de sterilizare a aparaturii utilizate și a mediului de cultură stabilit ca fiind optim la nivel de laborator. Începutul fazei de biosinteză este considerat momentul transferului culturii inocul în mediul de cultură sterilizat și răcit la temperatura de cultivare a microorganismului producător. Când raportul între capacitatea de inocul și cantitatea de mediu de fermentație (numit raport de inoculare) nu permite pregătirea culturii inocul în laborator este necesară introducerea unei trepte intermediare de cultivare, numite “cultura intermediar”.

În faza de stație pilot tehnologia elaborată la nivel de laborator este verificată și optimizată pe instalații de biosinteză de capacitate medie (pilot). Pe baza datelor de cercetare obținute la nivel pilot se elaborează așa numitul “proces tehnologic pilot” după care urmează o fază de experimentare industrială și apoi producția propriu-zisă probusului urmărit (enzimă, antibiotic etc). Datele furnizate de tehnologia pilot elaborată, constituie elemente de proiectare pentru instalațiile industriale.

2.3 Medii de cultură utilizate în procesul biotehnologic

În procesele biotehnologice, mediile de cultură sunt constituite din suporturi nutritive sterilizate care permit dezvoltarea și studiul unui microorganism în afara nișei ecologice naturale. Compoziția mediilor de cultură are o mare importanță asupra reproductibilității și eficienței tehnologiei respective.

În funcție de consistență, compoziție, scopul utilizării, mediile de cultură se clasifică astfel:

- după consistență:
 - medii lichide
 - medii solide
 - medii semisolide;
- după compoziție:
 - medii naturale, care conțin elemente nutritive, de origine vegetală sau animală;

- medii sintetice care conțin numai compuși cu structură chimică cunoscută care pot fi dozați;
- după tipul respirator al microorganismelor cultivate se deosebesc:
 - medii pentru microorganisme aerobe
 - medii pentru microorganisme anaerobe;
- după scaopul și frecvența întrebuințării deosebim:
 - medii de uz curent;
 - medii speciale utilizate în general în studiile de izolare a microorganismelor la nivel de laborator. Acestea pot fi la rândul lor: electiv, selective, de îmbogățire, de conservare, de identificare;
- după faza de biosinteză la care este utilizat mediul de cultură poate fi mediu laborator, pilot sau mediu de cultură industrial;
- după destinația finală a culturii dezvoltate mediile pot fi:
 - medii pentru cultura inocul;
 - medii pentru cultura de regim numite și medii de fermentație sau medii de biosinteză.

În biotehnologie se utilizează în mod curent mediile naturale având la bază subproduse agroalimentare, cum ar fi: șrot de floarea soarelui, de soia, făină de porumb, tărâțe de grâu, extractul de porumb. Aceste medii conțin în general elemente nutritive necesare dezvoltării microorganismelor, la care se adaugă de obicei cantități mici de săruri minerale.

Mediile naturale sunt în general mai ieftine dar prezintă dezavantajul variabilității compoziției, ceea ce nu permite o standardizare corespunzătoare și în consecință nu permite reproducerea procesului de biosinteză cu un randament constant. Spre deosebire de mediile naturale, mediile sintetice sunt perfect reproductibile la scară industrială.

Un mediu de cultură utilizat pentru dezvoltarea microorganismelor trebuie să conțină întodeauna:

- sursa de carbon (în general glucide: glucoză, amidon, lactoză, zaharoză, etc.)
- sursa de azot care poate fi organic (aminoacizi, proteine, uree), sau anorganic (NH_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, etc.)
- sursa de fosfor (H_3PO_4 , $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, KH_2PO_4 , etc)
- oligoelemente: K (din KCl sau K_2HPO_4); Mg (din MgSO_4); Fe (din FeCl_3)
- factori de creștere: aminoacizi, proteine, vitamine, coenzime.

Compoziția mediului nutritiv specific pentru un microorganism se stabilește în laborator, prin cultivarea acestuia, alegându-se astfel, în funcție de scopul urmărit, mediul optim de cultivare. Uneori, pentru creșterea randamentului în faza de biosinteză, se adaugă la mediu precursori care sunt substanțe având porțiuni structurale ale moleculei produsului de biosinteză.

În procesele de biosinteză, sursa principală de energie o constituie sursa de carbon, respectiv glucidele. În procesele catabolice, prin oxidarea biochimică a glucozei se eliberează o mare cantitate de energie, din care o parte este înmagazinată în compușii macroergici (ATP), iar restul este preluat de mediul de cultură cu ajutorul sistemelor de termostatare ale bioreactoarelor.

Sursa de carbon furnizează de asemenea necesarul de oxigen și hidrogen necesar dezvoltării microorganismului.

De exemplu, mediile de cultură utilizate în producția de enzime trebuie să conțină elementele esențiale: carbon, azot, sulf, oxigen, fosfor, magneziu, calciu și numeroase alte elemente în cantități foarte mici (urme): fier, cupru, cobalt, zinc, mangan, molibden - care sunt necesare funcțiilor celulare de bază. De cele mai multe ori este însă nevoie să se utilizeze un mediu de producere a enzimei cât mai ieftin și posibil de reprodus o perioadă cât mai lungă de timp. Aceasta conduce la utilizarea unor substraturi cât mai ieftine și mai accesibile în conjunctura economică respectivă; înlocuirea unui component din compoziția mediului nutritiv conduce la variații în randamentul de producere al enzimei, astfel încât studiul aprofundat al influenței diferitelor componente ale mediului de cultură asupra biosintezei enzimei, constituie un element important al cercetărilor în domeniul producției de enzime.

Sursa de carbon utilizată în compoziția mediilor de cultură pentru enzime este suplinită în mod obișnuit de glucide de o anumită puritate sau de un material natural conținând un amestec de glucide. Astfel, melasa de sfeclă sau de trestie este folosită în multe cazuri drept sursă de zaharoză. Alte surse de carbon utilizate în producția de enzime: siropul de glucoză, amidonul de porumb sau de cartofi, hidrolizatul de amidon de cereale (grâu, orez, porumb) sunt în mod frecvent folosite ca surse de glucoză, zerul ca sursă de lactoză.

Sursa de azot poate fi reprezentată în diferite forme de surse anorganice, cum ar fi: amoniacul, sărurile de amoniu sau amestecuri complexe de tipul extractului de drojdie, a celui de porumb, peptonă, făină de soia sau distilate solubile. Fosforul, sulful și cationii esențiali sunt, în general, supliniți de sărurile anorganice. Uneori se adaugă elemente specifice în cantități mici, dar de obicei acestea sunt aduse de apă sau de alte componente ale mediului. Dintre factorii de creștere, tiamina și biotina sunt necesare pentru creșterea microorganismelor.

2.4. Influența factorilor de mediu asupra creșterii microorganismelor

Creșterea microorganismelor într-un bioreactor este influențată de o serie de factori de mediu, dintre care cei mai importanți sunt:

- concentrația substratului
- calitatea și cantitatea inoculului
- temperatura
- pH-ul mediului de biosinteză
- agitarea
- concentrația O₂-ului dizolvat

2.4.1. Influența concentrației substratului asupra procesului de biosinteză

Celula microbiană, datorită volumului ei redus, este extrem de sensibilă la variațiile parametrilor procesului de biosinteză, în special la variațiile concentrației de substrat. Mărirea

concentrației de substrat în mediul de cultură poate conduce la sporirea numărului de celule microbiene, dar numai până la anumite limite, multiplicarea acestora fiind încetinită, de procese de inhibiție care au loc la nivelul celulei. Acțiunea unui inhibitor asupra celulei microbiene se poate exercita prin:

- modificarea potențialului chimic al substratului, intermediarilor metabolici sau a produsului finit;
- modificarea permeabilității peretelui celular și reducerea transportului substanțelor nutritive;
- modificarea activității enzimelor implicate în procesul metabolic;
- disocierea agregatelor metabolice;
- modificarea parametrilor funcționali ai celulei microbiene (capacitatea de multiplicare, mobilitatea, biosinteza unor metaboliți).

Mecanismele prin care se realizează inhibiția sunt:

- reacție chimică cu una sau mai multe componente celulare;
- adsorbția sau complexarea unor enzime sau coenzime;
- intervenția în secvențe a reacțiilor biochimice;
- intervenția în disocierea complexelor enzimatiche;
- modificarea parametrilor fizico-chimici ai mediului de biosinteză (pH, tărie ionică, constantă dielectrică, capacitate de solvatare);
- intervenția în funcțiile celulare de control.

Datorită acestor fenomene concentrațiile mari de substrat inhibă dezvoltarea microorganismelor într-un anumit grad ajungând chiar la inhibiție totală, motiv pentru care, pentru un sistem de biosinteză se stabilește concentrația optimă a substratului atât în momentul inițial cât și pe parcurs. De exemplu, pentru foarte multe bacterii concentrația de 10-15% în sursă de C (glucoză, zaharoză) este inhibitoare, ele dezvoltându-se bine la valori ale sursei de carbon sub 10%.

Acesta este motivul pentru care în soluții foarte concentrate de zahăr (de exemplu dulcețuri, siropuri) microorganismele în general nu se dezvoltă, acestea putând fi conservate pe o lungă perioadă de timp.

2.4.2. Influența dimensiunii inoculului

Calitatea și cantitatea inoculului joacă un rol important pentru obținerea unor metaboliți cu randamente dorite de biosinteză. Cel mai adesea se utilizează o cantitate mare de inocul pentru a determina o declanșare rapidă a dezvoltării culturii concomitent cu reducerea riscului de contaminare. În majoritatea cazurilor este necesar ca dimensiunea inoculului să se situeze între 3–10% din volumul total al culturii. Pentru fiecare tehnologie în parte se stabilește așa numitul “raport optim de inoculare” care definește dimensiunile optime ale inoculului.

Pentru asigurarea unei productivități și măsurarea densității inoculului se extrag probe din cultura aflată într-un anumit stadiu de evoluție optim pentru obținerea unei producții maxime a

metabolitului dorit și se determină parametrii specifici (numărul de germeni pe unitatea de volum, sau conținutul în biomasă uscată raportată la unitatea de volum). Efectele determinate de mărimea și vârsta inoculului sunt specifice pentru diferite microorganisme.

De exemplu, la **bacterii**, mărimea inoculului la bacterii are influență pronunțată asupra stadiilor ulterioare ale culturii, determinând diferite stări fiziologice ale celulelor în funcție de care variază capacitatea de biosinteză a metabolitului dorit. Când se utilizează o cantitate mare de inocul, se micșorează faza de lag datorită formării și acumulării unor metaboliți intermediari esențiali care pot difuza în celule și în mediul de cultură mai rapid decât în cazul utilizării unui inocul mic. Uneori însă, cantitățile mari de inocul determină apariția unui fenomen de autoinhibiție datorat sensibilității celulelor bacteriene față de unii produși metabolici intermediari. Pe de altă parte, când mărimea inoculului este însă prea mică, faza de lag poate fi prelungită la infinit și aceasta nu poate conduce la o dezvoltare normală a culturii de microorganisme. S-a observat că în cazul bacteriilor, pentru inițierea dezvoltării unui inocul este necesară prezența în mediul de cultură a unei concentrații critice de metale grele. De exemplu pentru un inocul de *Bacillus subtilis* este necesară prezența în mediul de cultură a unei concentrații minime de mangan, în vederea inițierii dezvoltării. Aceste cercetări subliniază importanța ionilor metalelor grele pentru faza de lag la bacterii.

În cazul **levurilor** cantitatea de inocul poate influența de asemenea durata fazei de lag sau stadiile ulterioare de dezvoltare, similar cu cele descrise în cazul bacteriilor.

În cazul **fungilor**, importanța standardizării inoculului vegetativ este hotărâtoare: pentru obținerea unui ritm rapid de dezvoltare este necesar să se utilizeze un inocul sub formă de suspensie de spori. De asemenea poate să apară fenomenul de autoinhibiție sau autostimulare a germinării sporilor datorită prezenței unor substanțe produse în timpul germinării sau în fazele ulterioare. În cazul fungilor cantitatea de inocul influențează mărimea și forma miceliului precum și randamentul în metaboliți. Raportul de inoculare trebuie să fie stabilit astfel încât cantitatea de miceliu dezvoltat ulterior să nu fie prea mare în detrimentul secreției metabolitului dorit. O dezvoltare abundentă a masei miceliene conduce în același timp la un consum mare de sursă de carbon, cultura fiind astfel inefficientă.

2.4.3. Efectul temperaturii asupra creșterii microorganismelor producătoare de enzime

Temperatura mediului în care are loc procesul de biosinteză este un factor extrem de important pentru dezvoltarea și activitatea microorganismelor. Temperatura este un factor care acționează în mod direct asupra microorganismelor, diferența între temperatura mediului înconjurător și cea din interiorul celulei trebuind să fie nulă. Pentru un proces de biosinteză industrial, temperatura poate fi considerată unul dintre parametrii fizici cei mai importanți care este implicat profund, prin efectele sale în optimizarea procesului.

Variațiile temperaturii au efect asupra randamentului de transformare a substratului în produsul dorit, asupra cerințelor nutritive ale microorganismului și compoziției biomasei obținute precum și asupra vitezei de creștere microbială. În funcție de domeniul de temperatură în care

microorganismele, ating viteza maximă de creștere, acestea se clasifică în : criofile, mezofile și termofile. Microorganismele industriale sunt în general mezofile, astfel încât acest domeniu este plasat în intervalul 25 – 35°C.

Efectul temperaturii asupra creșterii microorganismelor se explică prin faptul că aceasta afectează multe procese metabolice din celulă precum și compoziția biomasei în proteine și lipide, conținutul în ARN al celulei. Este posibil ca structura lipidică a membranei celulare să se modifice continuu în funcție de variațiile de temperatură, astfel încât membrana să-și mențină funcția reglatoare.

2.4.4. Efectul pH-ului asupra creșterii microorganismelor

Valoarea pH-ului este, alături de temperatură, un parametru important în procesele de biosinteză. Influența valorii pH-ului asupra dezvoltării culturilor microbiene se poate urmări în câteva direcții:

- În general microorganismele au un domeniu optim de pH pentru dezvoltare, în care viteza specifică de creștere atinge valoarea maximă. De exemplu, pentru anumite specii de drojdii domeniul optim de pH se situează între valorile de pH 4 și 5. Există însă și specii de drojdii care cresc la valori de pH în jur de 2 sau, dimpotrivă, la valori ridicate ale pH-ului în jur de 8 (de exemplu drojdiile din genul *Rhodotorula* folosite pentru biosinteza fenilalaninei). Cultivarea microorganismelor la valori scăzute ale pH-ului (pH 3 – 4) prezintă avantajul unui risc mai scăzut de contaminare, ceea ce este apreciat în mod deosebit în cazul unei cultivări industriale.
- Efectul valorii pH-ului asupra randamentului de conversie a substratului la un anumit produs. Formarea produsului dorit în urma procesului de biosinteză poate să fie legată de desfășurarea bioprocesului într-un domeniu foarte strict de pH. În timpul dezvoltării unei culturi microbiene apar deviații ale pH-ului de la valoarea considerată optimă care pot avea urmări nedorite asupra procesului de biosinteză. Aceste modificări se pot datora fie consumării unui nutrient (consumarea sursei de carbon sau consumarea sursei de azot, fie producerii unui acid organic de către microorganism). Pentru corectarea pH-ului la valoarea prescrisă se adaugă diverse substanțe chimice (acizi sau baze) alese în funcție de mai mulți factori.; în cazul în care valoarea pH-ului este sub cea prescrisă, se pot folosi, pentru corecție, soluții de NaOH sau KOH în funcție de compoziția chimică a mediului și de necesarul în ioni de Na^+ și K^+ al microorganismului; în același scop este mult răspândită utilizarea amoniacului gazos sau soluție. În situația în care valoarea pH-ului este peste cea recomandată se poate adăuga acid clorhidric, acid sulfuric sau acid azotic în funcție de caracteristicile microorganismului (ionul Cl^- să nu inhibe creșterea), de compoziția chimică a mediului (adăugarea de acid sulfuric ar putea conduce la formarea unor săruri greu solubile) precum și de materialul de construcție al vaselor de reacție și al bioreactoarelor (probleme de coroziune).

- Prin efectul de disociere a acizilor și bazelor, pH-ul acționează asupra caracteristicilor suprafeței celulei, modificând proprietățile ei de aderare la diferite materiale (sticlă, metale) precum și cele de floclare.

2.4.5. Concentrația de oxigen dizolvat

În culturile aerobe, este esențial să se realizeze dizolvarea în mediu a întregii cantități de oxigen necesare microorganismului în orice moment al fermentației, prevăzându-se în general un oarecare exces față de nevoi. De aceea se urmărește în general obținerea unor aerări cât mai eficiente, transferul de oxigen din faza gazoasă în faza lichidă (mediul de fermentație) având loc cu viteze mari. În cazul în care procesul de biosinteză se desfășoară în laborator la flacoane agitate, aerarea depinde de următorii parametri: viteza de rotație sau translație a agitatorului, mărimea flacoanelor Erlenmayer, volumul de mediu de cultură din flacon, creșterea turbulenței prin șicane.

Eficiența aerării unui mediu de cultură este reflectată de concentrația de oxigen dizolvat. Alegerea parametrilor sistemului de aerare este determinată de necesitatea furnizării unei cantități de oxigen suficientă pentru a asigura o valoare maximă a activității metabolice în reactoarele de biosinteză; în acest caz, un anumit microorganism și un anumit mediu de cultură se caracterizează printr-o rată de utilizare a oxigenului specifică. Pentru conducerea unui proces este esențială cunoașterea exactă a modului de variație în timp a necesarului de oxigen și a ratei consumului de oxigen.

Rata consumului de oxigen sporește rapid până la o valoare maximă încă din primele stadii ale procesului de biosinteză, scăzând apoi. Valoarea maximă a ratei de consum a oxigenului coincide de obicei cu momentul atingerii unei concentrații ridicate de celule microbiene. Necesarul de oxigen al culturii este influențat de mediul de biosinteză utilizat (de sursa de carbon. De exemplu, la fungii din genul *Penicillium*, necesarul de oxigen este dublu la utilizarea glucozei ca sursă de carbon față de zaharoză.

Alți factori care influențează transferul de O₂ sunt :

- Agenții tensioactivi din mediul de cultură determină o micșorare a coeficienților de transfer;
- Densitatea celulară: la concentrații ridicate vâscozitatea mediului crește iar eficiența sistemului de aerare scade, bulele tinzând să circule prin canale preferențiale, cu rezistență redusă la înaintare ;
- Sistemul de agitare al bioreactorului influențează sensibil concentrația oxigenului dizolvat: o agitare eficientă a mediului de cultură conduce la o dispersie corespunzătoare a bulelor de aer și deci la mărirea coeficientului de transfer a oxigenului;
- Echipamentul de aerare utilizat permite obținerea unei dispersii uniforme a bulelor de aer;
- Suprapresiunea favorizează mărirea concentrației de oxigen în mediul de cultură: în general procesele biotehnologice sunt conduse la suprapresiuni cuprinse între 0,5 – 1 atm (în scopul micșorării riscului de infecție).

CAPITOLUL 3

PRELUCRAREA MEDIILOR DE CULTURA IN SCOPUL IZOLARII SI PURIFICARII PRODUSELOR DE BIOSINTEZA

Înainte de a fi purificate, substanțele organice obținute pe cale biotehnologică sunt izolate din lichidul de cultură (dacă sunt extracelulare) sau din biomasă (dacă sunt intracelulare) într-o formă parțial purificată aplicând metode de separare general valabile pentru toate produsele de biosinteză.

Prelucrarea primară a mediilor de biosinteză cuprinde o serie de operații cum ar fi: filtrarea, centrifugarea, decantarea, concentrarea fazei lichide, dezagregarea celulelor, extracția, uscarea, atomizarea, precum și procese mai specifice de tipul precipitării cu solvenți sau cu săruri anorganice, purificării și concentrării prin ultrafiltrare.

Echipamentele industriale implicate sunt complexe și specifice. Schema de flux variază de la un preparat la altul, în funcție de tehnologie.

Separarea produselor din lichidul rezultat din fermentație, constituie o problemă dificilă, indiferent de procedeul aplicat. Dificultățile provin din faptul că produsele biologice active obținute în general prin biosinteză sunt substanțe termolabile, ceea ce impune evitarea degradării sau modificării chimice a acestora. Pentru a alege cea mai adecvată metodă de separare a produselor biosintetizate, este necesar să se cunoască proprietățile fizico – chimice a acestora și anume:

- Solubilitatea :
 - în apă sau în soluții diluate de săruri ;
 - în solvenți polari (metanol, etanol, acetonă) ;
 - în solvenți slab – polari (cloroform, hidrocarburi) ;
- Stabilitatea în soluție :
 - în funcție de pH ;
 - efectul temperaturii ;
 - efectul soluțiilor tampon ;
 - efectul solvenților organici ;
- Stabilitatea în stare solidă în funcție de temperatură precum și efectul umidității asupra produsului ;
- Proprietăți fizice :
 - dializabilitate prin membrane ;
 - adsorbția pe suprafețe solide ;
 - migrarea în câmp electric ;
 - sedimentarea în ultracentrifuge ;
- Proprietăți chimice :
 - stabilitatea față de diverse enzime ;
 - stabilitatea la acțiunea unor agenți chimici.

Pentru separarea produsului din mediile de biosinteză se aplică în general următoarele metode: extracția cu solvenți organici; separarea pe schimbători de ioni; cromatografie; adsorbția.

În industria de biosinteză există însă metode de prelucrare integrală a mediului de cultură prin aplicarea diferitelor metode de uscare, produsul rezultat fiind utilizat ca atare. Acest mod de prelucrare a mediilor de biosinteză este mult aplicat în tehnologia aditivilor furajeri (conținând aminoacizi, enzime, vitamine).

3.1. Filtrarea mediilor de biosinteză

Față de filtrarea substanțelor chimice, filtrarea mediilor de biosinteză ridică adesea probleme datorită compoziției chimice deosebit de complexe a mediilor și apariția materialului biologic (bacterii, fungi) care complică fenomenul. Operația de filtrare a mediilor de biosinteză este adeseori ușurată prin utilizarea adjuvanților de filtrare care formează în cursul operației straturi microporoase micșorînd diametrul aparent al porilor și implicit măbind eficiența de colectare prin reținerea unor particule de diametru mai scăzut. Utilizarea lor industrială conduce la mărirea vitezei de filtrare și reducerea consumurilor de materiale.

O variantă a operației de filtrare mult utilizată în biotehnologie este filtrarea sterilizantă. La prelucrarea suspensiilor se execută întâi o prefiltrare grosieră, urmată de filtrarea sterilizantă propriu zisă. Pentru filtrarea sterilizantă se montează în filtru plăcile (din acetat de celuloză, azbest sau polimeri sintetici) cu diametru redus al porilor, executând apoi în mod normal operația de filtrare.

3.2. Dezagregarea celulelor de microorganisme

Când substanțele biologice active care interesează și care s-au format în cursul procesului de biosinteză sunt intracelulare este necesară distrugerea membranei celulare semipermeabile și a peretelui protector în vederea recuperării componentelor respective. Această operație se realizează prin procedee de dezagregare. După natura agentului de dezagregare utilizat, procedeele de dezagregare ale celulelor microbiene se clasifică în :

- procedee mecanice
- procedee fizice nemecanice
- procedee chimice
- procedee enzimatic.

Procedeele mecanice cuprind dezagregarea celulelor în mori coloidale sau în mori vibratoare, menținând un anumit raport de recirculare, până la dezagregarea totală a celulelor microbiene; în timpul operațiilor de dezagregare mecanică are loc o creștere a temperaturii materialului biologic. Evitarea acestui fenomen și menținerea sistemului la o temperatură acceptabilă se efectuează prin circulația unui agent de răcire prin mantaua aparatului.

Dezagregarea celulelor de microorganisme prin procedee fizice nemecanice se poate efectua prin decompresie rapidă, prin înghețare lentă (datorită sporirii volumului apei la trecerea în stare solidă) sau prin șoc osmotic. Un procedeu deosebit de eficace este aplicarea de vibrații ultrasonice suspensiei de celule. Vibrațiile cu frecvențe de cca. 20.000 Hz determină dezintegrarea celulelor microbiene.

Dezagregarea celulelor microbiene prin procedee chimice cuprinde distrugerea componentelor lipoproteice ale membranei celulare prin acțiunea detergenților cationici sau anionici sau a solvenților organici, determinând trecerea în faza lichidă a unora din componentele biologice active.

Dezagregarea celulelor microbiene poate fi efectuată și prin tratarea acestora cu diferite preparate enzimatic. Astfel, liza celulelor bacteriene poate fi indusă prin atacul enzimatic specific al legăturilor α -1,4 dintre moleculele de N-acetilglucozamină și acidul N-acetilmuramic.

Dezintegrarea biologică enzimatică este una din cele mai vechi metode de obținere a omogenatelor celulare. Cel mai cunoscut exemplu este cel al descompunerii autolitice a drojdiei de bere uscată la 30°C, timp de 2–3 zile. Dezintegrarea celulelor de *Micrococcus lysodeikticus* poate fi realizată cu suc pancreatic; distrugerea țesutului muscular poate fi produsă cu enzime

proteolitice izolate din *Bacillus subtilis*, iar dezintegrarea biologică a *E.coli* poate fi realizată cu bacteriofagi litici.

3.3. Concentrarea mediilor de biosinteză a enzimelor

Mediile de biosinteză se concentrează prin operații specifice industriei chimice, cu deosebire că este necesară protejarea lichidelor biologice datorită permeabilității acestora. Se utilizează adeseori evaporarea în vacuum care permite efectuarea operației la temperaturi relativ scăzute (25 – 50°C). În ultimul timp se practică cu succes procedeele de concentrare atermică, ultrafiltrarea și osmoza inversă.

Concentrarea prin ultrafiltrare. Ultrafiltrarea reprezintă procesul de separare a componentelor unei soluții datorită diferențelor de volum molecular cu ajutorul unei membrane. Ultrafiltrarea este un procedeu de separare și purificare a substanțelor biologic active, având următoarele avantaje:

- permite efectuarea concentrării la temperaturi scăzute micșorând fenomenele de autodigerare și pierderile în activitate prin denaturarea termică.
- nu necesită modificări de fază (evaporări, condensări).
- nu utilizează substanțe chimice.
- permite purificarea soluțiilor biologic active prin îndepărtarea unor componente cu volum molecular inferior.

Cercetările privind introducerea proceselor cu membrane, urmăresc în general, stabilirea posibilităților de utilizare eficientă a unor tipuri de membrane la concentrarea și purificarea produselor biologic active, în cadrul elaborării tehnologiilor de obținere a acestora. Dintre aplicațiile ultrafiltrării, cele din domeniul biotehnologiei ocupă un loc major, metoda fiind utilizată adesea la concentrarea și purificarea enzimelor de origine microbiană.

De exemplu, în procesul de izolare și purificare a enzimelor, una din etape o constituie demineralizarea soluției enzimatică; această operație are loc în paralel cu concentrarea prin ultrafiltrare întrucât ionii anorganici având volum mic trec prin membrana de ultrafiltrare; astfel, aplicarea metodei de concentrare prin ultrafiltrare a soluțiilor enzimatică conduce la eliminarea operației de dializă, efectuată în mod obișnuit într-un flux de purificare.

Uscarea prin atomizare a mediilor de fermentație cu activitate enzimatică. Uscarea prin pulverizare se folosește pentru materialele care în faza inițială sunt lichide (soluții, suspensii, paste subțiri). Acestea, în vederea uscării sunt pulverizate în particule de dimensiuni mici. Prin pulverizare la dimensiuni mici se înțelege obținerea unei suspensii de lichid constituită din particule de dimensiuni între 2 și 200 μm.

Dat fiind dimensiunile particulelor, operația a fost denumită și atomizare; în uscătoarele cu pulverizare, uscarea are loc foarte repede, astfel încât, materialul nu are timp să se încălzească peste limita admisibilă și temperatura lui este apropiată de temperatura de evaporare a lichidului. Materialul uscat se obține sub formă de pulbere și nu este necesară o mărunțire ulterioară. Metoda este aplicată în general în condiționarea enzimelor de mare tonaj, utilizate în hrana animalelor ca aditivi furajeri (proteaze, amilaze, celuloze) și se realizează prin atomizarea integrală a mediului de cultură fără o altă purificare.