



**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ DIN
BUCUREȘTI**



FACULTATEA DE BIOTEHNOLOGII

TEZĂ DE DOCTORAT

**SISTEME BIOLOGICE ȘI BIOCHIMICE DE
DEGRADARE A PRODUSELOR DIN PIELE
NATURALĂ**

Doctorand: DUMITRU MIOARA ANCUȚA

**Conducător științific:
*Prof. Univ. Dr. Ing. Ștefana JURCOANE***

**București
2019**

REZUMAT

SISTEME BIOLOGICE ȘI BIOCHIMICE DE DEGRADARE A PRODUSELOR DIN PIELE NATURALĂ

Conducător științific: Prof. Univ. Dr. Ing Ștefana JURCOANE

Doctorand: DUMITRU Mioara Ancuța

Cuvinte cheie: *Sistem biologic, degradarea blănurilor naturale, proteinază, collagenază, keratinază, lipază, carbon organic, biofertilizator, agricultură ecologică, deșeuri de blană naturală, identificarea microorganismelor, hidroliza enzimatică, biodegradare.*

Industria pielăriei produce anual tone de deșeuri care sunt considerate a fi extrem de dăunătoare pentru mediu. Resturile solide generate de industria pielăriei conțin ca element de bază proteina, dar din cauza substanțelor folosite în prelucrare, acestea devin foarte greu de degradat, rămânând ca deșeuri sau se incinerează producând de asemenea poluarea mediului înconjurător.

În ziua de astăzi sectorul biotehnologic ne permite să utilizăm aceste deșeuri ca substrat microbial pentru producția de enzime. Enzimele obținute pot avea utilizări multiple și pot acoperi diverse nevoi industriale. Pielea fiind un material bazat pe carbon organic, bogat în proteine poate fi utilizată pentru îmbunătățirea solului în azot și substanțe minerale, ce poate duce la o bună creștere și dezvoltare a recoltelor în agricultura ecologică.

Scopul cercetărilor a fost acela de obținere a unui preparat enzimatic utilizat pentru degradarea blănurilor naturale.

Obiectivele cercetărilor au fost:

- izolarea unor microorganisme cu eficiență în degradarea accelerată a deșeurilor din industria pielăriei.
- obținerea unui preparat enzimatic parțial purificat posibil de utilizat în degradarea biochimică a deșeurilor din industria pielăriei.
- valorificarea hidrolizatului ca biofertilizator. Experimentele s-au desfășurat în condiții de laborator, în cadrul Facultății de Biotehnologii aparținând Universității de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București.

Pentru realizarea experimentelor de biodegradare a blănurilor au fost testate mai multe tipuri de blană și piele tăbăcite cu crom provenite din sectoarele industriale.

S-au luat în lucru bucăți de piele și blană naturală de oaie, tăbăcite cu crom, precum și bucăți de piele și blană ecologică, materiale ce au fost puse la dispoziție de către Institutul de Pielărie București.

Pentru screeningul microorganismelor s-a luat în considerare izolarea și selecția acestora prin metode microbiologice uzuale.

Materialul biologic utilizat în biodegradarea blănurilor naturale a constat în trei tulpini bacteriene ce au fost izolate în urma degradării unor resturi de blană și piele tăbăcite cu crom, provenite de la Institutul de Pielărie București.

Teza este structurată în două părți, după cum urmează:

Prima parte a tezei cuprinde date din literatura de specialitate cu privire la tema tezei de doctorat prezentate și este structurată în două capitole.

Capitolul I prezintă generalități privind sistemele biologice de degradare a produselor din piele, precum și aspecte privind compoziția produselor din piele naturală. De asemenea, sunt prezentate date referitoare la descrierea detaliată a tehnologiilor de degradare biologică a resturilor de blănuri naturale aplicate industrial.

Capitolul II prezintă sistemele biochimice de degradare a produselor din piele naturală precum și descrierea sistemului enzimatic implicat în degradarea blănurilor.

Partea a doua a tezei este alcătuită din contribuțiile originale efectuate pe parcursul cercetării.

Tema de cercetare a urmărit:

- izolarea, selecția, caracterizarea, identificarea și testarea microorganismelor cu eficiență în degradarea accelerată a deșeurilor din industria pielăriei;
- experimentarea biodegradabilității principalelor componente ale articolelor de blană naturală tăbăcită cu crom;
- obținerea unui produs fermentat care să poată fi utilizat drept biofertilizator pentru culturile de cereale și leguminoase.

Capitolul III cuprinde informații referitoare la izolarea și caracterizarea unor tulpini microbiene capabile să degradeze blănurile, materialele și metodele utilizate în cadrul experimentelor de laborator privind selecția, identificarea și cultivarea tulpinilor selectate, precum și rezultate și discuții referitoare la obținerea materialului biologic și identificarea lui.

Etapa de izolare a microorganismelor, s-a efectuat prin compostarea unor fragmente de piele și blană tăbăcită cu crom provenite de la Institutul de Pielărie București.

Pentru izolarea și identificarea bacteriilor cu activitate proteolitică, bucăți de blană cu piele tăbăcită cu crom, provenind de la diferite tipuri de animale au fost lăsate la compostat în sol cu pH 7,2 timp de 3 luni; din solul cu blană compostată s-a luat o probă, din care s-au izolat într-o primă etapă 90 de colonii, aplicând tehnici microbiologice uzuale.

Prin cultivarea coloniilor izolate, pe medii agarizate cu conținut în caseină s-a constatat (ceea ce era de așteptat, dat fiind conținutul în proteine al blănurilor), că în jurul coloniilor izolate s-a observat apariția unui halou opalescent fapt ce indică activitatea proteazică a microorganismelor izolate.

Pe baza dimensiunii haloului observat în jurul coloniilor izolate, după dezvoltarea pe medii agarizate (cu conținut în caseină), s-au selectat trei tulpini microbiene denumite: DA7, DA10, DA13, care apoi au fost trecute și întreținute pe geloză agarizată și depozitate la 4°C.

Cele 3 tulpini microbiene selectate au fost identificate cu sistemul BIOLOG–Microbial Identification System, ca fiind tulpini bacteriene. În urma testelor făcute s-a concluzionat că cele trei tulpini selectate și identificate sunt:

- *Brevundimonas diminuta* (DA7),
- *Bacillus thuringiensis* (DA10),
- *Bacillus cereus* (DA13)

Tulpinile selectate și identificate au fost cultivate în sistem submers, în vederea obținerii unui preparat enzimatic parțial purificat, posibil de utilizat în degradarea biochimică a deșeurilor de blanăși piele din industria textilă; produsul enzimatic obținut a fost testat și pentru activitatea colagenazică, keratinolitică precum și lipolitică, dat fiind cultivarea și selecția tulpinilor pe medii de cultură conținând bucăți de blană și piele naturală.

În urma testărilor se constată că cea mai bună activitate enzimatică a fost înregistrată de tulpina DA10, urmată de tulpina DA13, la un pH de 7,0.

Capitolul IV al lucrării cuprinde experimentări privind obținerea unui preparat enzimatic destinat biodegradării unor deșeuri din industria pielăriei, materialele și metodele de analiză și control folosite pentru determinarea activităților enzimaticice ale acestuia, precum și rezultatele și discuțiile privind optimizarea parametrilor de degradare enzimatică a produselor din blană.

În cadrul tezei s-a stabilit de asemenea un flux de obținere a unui preparat enzimatic, utilizând în fermentație cele trei tulpini bacteriene, selectate și caracterizate, pe parcursul cercetărilor efectuate în stagiul doctoral.

Din analiza rezultatelor prezentate în capitolul 4, se poate concluziona că, **blana naturală poate fi utilizată ca sursă de carbon**, înregistrându-se valori semnificative ale producției de enzime în cazul tulpinilor izolate **DA7, DA10, DA13**(mediul de fermentație, prezentând activități proteolitice, colagenazice, keratinolitice, lipolitice semnificative).

Pe baza rezultatelor prezentate în acest capitol se poate concluziona că:

Valoarea concentrației de blană naturală marunțită și adăugată în mediul de cultură în proporție de 0,6 g% **poate să inducă biosinteza de enzime hidrolitice**, capabile să degradeze resturile de blanăși piele tăbăcită cu crom, rezultate din industria textilă.

Rezultatele experimentărilor arată că cea mai ridicată producție de protează se realizează în cazul cultivării tulpini DA10 pe mediul minimal, la un pH 7,0, egală cu 0,677U/ml/min

În același capitol 4 s-a studiat, influența temperaturii și pH-ului asupra producției de enzime: colagenază, keratinază, lipază; astfel s-a ajuns la următoarele concluzii:

Influența temperaturii asupra producției de collagenază pentru tulpina DA7 a înregistrat valoarea de 0,380U/ml, **pentru DA10, 0,401U/ml**, iar pentru DA13 valoarea a fost egala cu 0,394/ml.

Temperatura influențează producția de keratinază, cel mai bun randament fiind la 35°C; se pot observa următoarele valori: 0,180 U/ml pentru tulpina DA7, **0,248 U/ml pentru tulpina DA10** și 0,223 U/ml o înregistrează tulpina DA13.

S-a constatat, că temperatura are influență și asupra producției de lipază. **Producția maximă de lipază a fost obținută cu tulpina DA10, la temperatura de 35°C, după o perioadă de incubare de 120 de ore, valoare egală cu 140 U/ml**

- **Din studiul influenței pH-ului** asupra activității enzimelor menționate se poate constata, în urma testărilor efectuate, că pH-ul influențează producția de lipază, aceasta înregistrând valori de 100 U/ml pentru tulpina DA7, **160 U/ml pentru DA10** și 160 U/ml/min pentru DA13 la pH neutru.
- **Valoarea cea mai ridicată pentru producția de keratinază se obține cu tulpina DA10**, la un pH egal cu 7,0 și 120 ore de incubare și anume 0,254 unități/ml.

S-au efectuat teste de biodegradabilitate a blănurilor naturale; s-a determinat concentrația de carbon organic a mediului de cultură după adaugarea de bucăți de blanăși piele tăbăcită în mediul de cultură a celor 3 tulpini.

- Concentrația de carbon organic este vizibil redusă, rezultat al activității microbiene ce a utilizat carbonul din bucățile de blană pentru producția enzimatică; astfel concentrația de carbon organic a scăzut de la 35,68 % inițial până la 24,63 % pentru tulpina DA7, 24,82% pentru tulpina DA 10 și 25,75% pentru tulpina DA13, după incubarea timp de 120 ore a bucăților de blană naturală în mediul de cultură.
- Analiza datelor obținute arată o creștere a activității complexului enzimatic proporțional cu perioada de timp în care au fost cultivate tulpinile microbiene.
- Cea mai ridicată activitate de producție keratinolitică de către tulpinile izolate a fost de 0,223 U/ml față de martor, produsă de tulpina DA10 în condițiile de cultivare date.

Este prezentat fluxul de condiționare și caracterizare a preparatului enzimatic obținut cu cele trei tulpini selecționate în cadrul tezei.

S-a stabilit fluxul de obținere și condiționare a preparatului enzimatic, respectiv:

- după faza de fermentație, soluția nativă separată de biomasa prin centrifugare s-a concentrat de 10 ori într-un rotavapor, sub vid, la temperatura de 35 grade Celsius și apoi s-a utilizat ca atare în aplicații.
- după concentrarea hidrolizatului obținut în cadrul lucrării se concluzionează că cea mai bună activitate enzimatică a înregistrat-o tulpina DA10 după cum urmează: proteaze 1,975 U/ml, collagenaze 1,275 U/ml, keratinaze 0,911 U/ml și lipaze 80 U/ml.

În vederea creșterii stabilității preparatului enzimatic de origine microbiană s-a recurs la procedeul de liofilizare.

Pentru obținerea unui preparat enzimatic solid cu activitate enzimatică cât mai ridicată, s-au aplicat ambele metode pentru aceeași probă: lichidul de fermentație centrifugat (pentru înlăturarea biomasei) s-a concentrat de 10 ori, la rotavaporul Heidolph și apoi concentratul obținut s-a liofilizat.

Preparatul enzimatic liofilizat s-a caracterizat din punct de vedere al activității enzimatice, după redizolvarea în 10 ml apă distilată, obținându-se următoarele valori:

Activitate proteolitică (la pH=7,0)=19,75U/ml

Activitate colagenazică: 12,5 U/ml

Activitate lipolitică: 800U/ml

Activitate keratinolitică: 9U/ml

În capitolul V al tezei s-au demarat lucrări de testare a concentratului enzimatic lichid obținut în cadrul tezei, în vederea valorificării acestuia, ca biofertilizant în agricultura ecologică.

Experimentele au constatat în testarea lichidului de fermentație obținut după cultivarea tulpinilor selecționate pe medii de cultură în care s-au adăugat deșeuri de blană naturală și piele tăbăcită cu crom; pe parcursul biosintezei enzimelor a avut loc o hidroliză a bucăților de blană marunțită rezultând aminoacizi, acizi grași, lipide, keratină, fapt dovedit prin creșterea cantității de biomasă în mediu și determinarea activităților enzimatice.

După biosinteza s-a procedat la filtrarea mediului de fermentație, concentrare de 10 ori la rotavapor și apoi adăugare în diferite proporții în solul de germinare a semințelor de cereale și leguminoase.

Experimentul a urmărit stabilirea unei concentrații favorabile dezvoltării plantulelor luate în lucru.

Adaosul de preparat enzimatic s-a dovedit a fi eficient în creșterea și dezvoltarea culturilor de graminee și leguminoase.

Dintre cele trei tulpini testate, *B. thuringiensis* s-a dovedit a avea cele mai bune rezultate la testarea in vitro ca biofertilizator adăugându-se în concentrație de 35% în solul de cultivare a gramineelor și leguminoaselor.

Mediul de fermentație obținut prin cultivarea tulpinilor izolate având ca sursă de carbon piele și blană naturală provenită de la Institutul de Pielărie București, s-a prelucrat prin filtrare și concentrare obținându-se un produs microbiologic concentrat, lichid, utilizat ca adaos biofertilizant și în culturi vegetale de *R. sativus*, *Triticum sp.* și *S. tuberosum*.

În cazul fertilizării *S. tuberosum* se observă că și specia are o mare influență asupra dezvoltării în prezența fertilizantului.

Capitolul VI al tezei cuprinde Concluziile și recomandările privind direcțiile de cercetare.

Din cercetările efectuate în cadrul tezei s-a dovedit posibilitatea obținerii unor produse enzimatice capabile să degradeze deșeurile din blană naturală

precum și valorificarea acestora și în alte domenii, cum ar fi obținerea de biofertilizant pentru plante.