

Stadiul si rezultatele obtinute in Etapa II/2015

Activitatea II.1 **Caracterizarea morfo-fiziologica, de cultura si moleculara a noilor tulpini de drojdii lactice adaptate si selectate**

Tulpinile de drojdii adaptate *Kluyveromyces marxianus* ZIM 1867 si *Kluyveromyces marxianus marxianus* NRRLY 1195, prezinta caracteristici culturale identice cu cele ale tulpinilor parentale. Acestea au prezentat colonii de dimensiuni aproximativ egale (3-4 mm), iar forma si structura coloniilor nu a fost diferita, caracteristice fiind forma circulara, aspectul cremos, neted si mat, profilul bombat, culoarea alb galbena.

In ceea ce priveste concentratia microbiana, tulpinile testate au prezentat o concentratie un pic mai mare fata de tulpinile parentale, iar tulpinile crescute pe substrat de zer acid deproteinizat imbogatit au prezentat o concentratie mai mare, dar nu semnificativ mai mare fata de cele cultivate pe substrat zer acid deproteinizat simplu.

Din punct de vedere molecular, datele obtinute arata ca atat pentru *Kluyveromyces marxianus* ZIM 1867 cat si pentru *Kluyveromyces marxianus marxianus* NRRLY 1195 numarul benzilor polimorfice obtinute nu se modifica in functie de conditiile in care au fost realizate experimentele. Cu alte cuvinte, mediile pe care s-au dezvoltat drojdiile genului *Kluyveromyces* nu determina instabilitatea genetica sau expansiunea unor secvente repetitive. Analizele de tip melting si HRM au evidentiat diferente clare intre ADN-ul extras de la *Kluyveromyces marxianus* si *Kluyveromyces marxianus marxianus* si au aratat ca materialul genetic al fiecarei specii nu se modifica in conditiile in care au fost cultivate.

Activitatea II.2 **Obtinerea de suplimente (aditivi) furajere cu drojdii lactice ca atare sau in asociere cu alte pre/probiotice si excipienti, la nivel de laborator**

Pe baza studiilor efectuate in cadrul Companiei Romvac si a unor date din literatura de specialitate, s-a realizat o formula de aditiv furajer – OLIGOLAC ANIMAL PREMIX- , care contine biomasa de drojdii lactice din kefir (*Kluyveromyces marxianus marxianus*), drojdie de bere (*Saccharomyces cerevisiae*), selenit de sodiu, caolin, lactoza, carbonat de calciu. Acest aditiv furajer bioactiv a fost caracterizat fizico-chimic (aspect, culoare, miros, pierdere prin uscare, reziduu la calcinare, azot organic total, continut de apa) si microbiologic, pentru a demonstra stabilitatea in timp a preparatului si identitatea

comparativa cu produse de acest tip. Proba corespunde din punct de vedere al numarului total de bacterii si fungi, incadrandu-se in limitele de admisibilitate, categoria premixuri, este lipsit de bacterii Gram negative bile-tolerante si nu este contaminata cu *Escherichia coli* si *Salmonella*.

Pentru determinarea cantitativa a continutului de seleniu din acest premix s-au folosit doua tehnici moderne: spectrometrie de masa cu plasma cuplata inductiv (ICP-MS) si spectrometrie de absorbtie atomica cu cuptor de grafit (GF-AAS). Rezultatele obtinute prin cele doua tehnici au fost similare respectiv 7,885 mg/kg prin tehnica GF-AAS si 7,968 mg/kg prin tehnica ICP-MS.

S-au facut recomandari privind administrarea suplimentului furajer OLIGOLAC - ANIMAL PREMIX, la toate speciile si categoriile de animale atat de interes economic cat si social si ecologic: tineret in perioadele critice (criza de intarcare), animale aflate in convalescenta, animalele in varf de productie (vacii in lactatie, tauri reproducatori, gaini pentru obtinere de oua cu seleniu organic, in varful si la sfarsitul curbei de ouat, purcei la ingrasat).

Aditivul se administreaza in furaje concentrate, in raport de 1 – 5%, dupa caz.

In ceea ce priveste testarea produsului, acesta a fost integrat in furaje si administrat la pui SPF (specific pathogen free) de o zi, urmarindu-se influenta asupra palatabilitatii, influenta asupra unor caractere zootehnice (spor in greutate), precum si asupra raspunsului imun indus de vaccinurile contra psudopestei si bursitei aviare.

Activitatea II.3 Obținerea și caracterizarea fizico-chimică și microbiologică a biomasei levuriene. Izolarea și caracterizarea analitică a oligozaharidelor prin tehnici performante SM și RMN

Polizaharidele din peretii celulari ai drojdiilor, reprezentati prin β -glucani si manani, formeaza o clasa importanta de compusi bioactivi cu larga utilizare atat in industrie, cat si in medicina ca agenti naturali de protectie cu efect imunomodulator, antineoplazic si antioxidant.

Ca sursa de polizaharide se foloseste tulpina de drojdie *Kluyveromyces marxianus* NRRLY 1195, care se cultiva pe un mediu de zer acid clarificat, deproteinizat (permeat), neimbogatit cu alte surse de substante nutritive (saruri minerale, extract de drojdie). Fermentatia s-a realizat in laborator, in sistem submers, in baloane Erlenmeyer de 500

mL, continand 350 mL mediu de cultura si 10% v/v inocul (35 mL), modul de operare fiind in sarje (sistem batch). Conditiiile experimentale de fermentare: temperatura 35⁰C, pH= 4-5, agitare 200 rpm, timp= 24-72 ore. In urma analizei rezultatelor privind efectul duratei de cultivare asupra biomasei celulare, s-a stabilit ca o acumulare semnificativa a acesteia (9,68g/ L) se produce la 67 ore de cultivare submersa. Biomasa levuriana obtinuta se caracterizeaza din punct de vedere fizico-chimic si microbiologic.

Extractia polizaharidelor din celulele de *Kluyveromyces marxianus* NRRLY 1195 se realizeaza in mai multe etape: liza celulelor de drojdie si separarea peretilor celulari insolubili de citoplasma; extractia β -glucanilor si a manoproteinelor din peretii celulari; deproteinizarea si extractia manan oligozaharidelor

Pentru dezagregarea peretilor celulari s-au aplicat 2 categorii de metode de fragmentare: mecanice (moara cu bile, ultrasonicare) si non-mecanice (autoclavare, autoliza, digestie enzimatica).

β -glucanii si manoproteinele s-au izolat prin metoda alcalina, utilizand diferite volume de solutii de NaOH cu diferite concentratii, la temperaturi variate, pentru perioade de timp diferite, cu agitare continua urmata de racire la temperatura camerei. Conditiiile optime de extractie a manoproteinelor sunt: solutie NaOH 1N, raport proba solutie alcalina 1:5 (w/v), temperatura de 90⁰C, timp de 2 ore. Manoproteinele si β -glucanii se determina gravimetric. In urma studiului efectuat, se evidentiaza ca fractia alcalin solubila, reprezentata de manoproteine, constituie circa 1,2 – 3,44 % su.

Deproteinizarea complexului manoproteic s-a realizat prin doua metode: metoda Sevage si metoda cu acid tricloracetic 10%. Metoda cu acid tricloracetic este mai buna, conditiile recomandate pentru separarea proteinelor fiind acid tricloracetic 10%, 15 ore, de doua ori.

Identificarea oligozaharidelor s-a realizat prin tehnici performante SM si RMN.

Activitatea II.4 **Realizare model experimental de obtinere a microelementelor chelatare cu aminoacizi si caracterizarea acestora in solutie si pe produsul uscat prin HPLC si ICP-OES**

A fost analizat continutul de aminoacizi pentru 2 probe de drojdii, *Kluyveromyces marxianus* si *Saccharomyces cerevisiae*, utilizand o tehnica moderna, cromatografia de

schimb ionic cu detectie amperometrica si gradient de concentratie. Aceste drojdii au fost introduse intr-un premix destinat hranei animalelor.

A fost dezvoltat un protocol de obtinere aminoacizi chelatati, care presupune trei etape principale: obtinerea hidrolizatului de drojdie, optimizarea procesului si analiza chelatilor.

Se analizeaza pentru fiecare etapa hidrolizatului de drojdie, determinandu-se profilul de aminoacizi.

Pentru a se obtine exclusiv chelati se introduc metalele ca saruri/oxizi insolubili. Se pot efectua experimente de optimizare prin variatia timpului de ultrasonare, a puterii aplicate, a timpului de incubare sau a temperaturilor de reactie. In final, se reduce cantitatea de compus insolubil al metalului de chelatat, lasandu-se un exces de 10% fata de cantitatea reactionata.

In solutiile rezultate se determina continutul de ioni liberi si se separa aminoacizii/peptidele nereactionate si diferitii chelati ai metalelor cu aminoacizi/peptidele din hidrolizat prin lichid - cromatografie.

Pe produsul uscat se poate realiza: analiza termogravimetrica, fluorescenta de raze X, analiza cantitatii de metal, analiza FTIR. Analiza termogravimetrica trebuie sa delimiteze temperatura de descompunere a diferitilor chelati, iar analiza FTIR trebuie sa evidentieze o deplasare a benzii de vibratie a azotului (implicat in chelatarea ionului metalic) de la 3000-3500 cm^{-1} (estimare).

Activitatea II.5 Inregistrarea, stocarea si analiza datelor necesare pentru dezvoltarea industriala Experimentari la nivel pilot pentru stabilirea parametrilor tehnologici optimi.

S-a urmarit sistematizarea datelor obtinute in cadrul activitatilor din 2014 si 2015, si rezolvarea unor tehnologii optime la nivel de „statie pilot” pentru obtinerea de biomasa de drojdii lactice (*K.m.m.*), avand ca mediu de cultura zerul, in scopul valorificarii superioare a acestuia.

Metodele utilizate cuprind: obtinerea zerului deproteinizat; prepararea, sterilizarea si controlul mediilor de cultura din zer deproteinizat; cultivarea *K. marxianus marianus NRRLY 1195R* pe mediile de cultura; recoltarea biomasei levuriene.

Deproteinizarea zerului presupune: delipidarea, prin centrifugare; purificarea si sterilizarea zerului integral prin filtrari succesive prin filtre clarifiante si sterilizante; deproteinizarea zerului steril prin trecerea lui prin caseta Millipore cu suprafata de 2,5 m² si porozitate de 1000Kda si 10 Kda.

Filtratul (zerul deproteinizat) a fost utilizat la prepararea unor variante de mediu pentru cultivarea drojdiilor si bacteriilor lactice. Au fost preparate sapte variante de mediu de cultura, doua variante din zer de capra, cinci variante din zer bovin. Rezultatele obtinute demonstreaza posibilitatea valorificarii integrale a lactozei din zerul prelucrat si obtinerea de biomasa la nivelul datelor comunicate de alti cercetatori in domeniu.

Pentru obtinerea de suplimente furajere stabile pe timp determinabil, s-a realizat conditionarea prin liofilizare a concentratelor de *Kluyveromyces marxianus marxianus*. Etapele liofilizarii cuprind: congelarea, sublimarea, uscarea secundara, inchiderea procesului dupa aproximativ 44 de ore de lucru. Produsul astfel obtinut se foloseste ca atare, reprezentand baza extractelor si prepararii de oligozaharide si metale chelate, sau se poate combina cu alti ingrediente pentru obtinerea de premixuri furajere.