

Stadiul si rezultatele obtinute in Etapa I/2014

1. Remont hala de crestere si exploatare pasari SPF, amenajare voliera pentru experimente pe porumbei. Selectarea si organizarea loturilor de animale martor si experimentale. Pregatirea personalului pentru aplicarea metodei

Activitatile desfasurate au avut ca scop pregatirea resursei de pasari (gaini, pui, embrioni, oua) SPF si porumbei pentru testele „in vivo”. Pasarile SPF (specific pathogen free) sunt crescute in izolatoare, in conditii speciale. Testele efectuate nu au identificat germeni patogeni specifici si anticorpi specifici acestora.

Ciclul de crestere si exploatare a acestor pasari este de aproximativ 500 zile. Dupa inchiderea unui ciclu de viata izolatoarele sunt depopulate si se pregateste noul ciclu prin operatiunea de remont a cladirii, izolatoarelor, instalatiei de apa si instalatiei electrice.

Lotul de porumbei, cu un efectiv de 90 porumbei conventionali, rasa comuna, a fost constituit dupa amenajarea unui adapost specific.

Pregatirea personalului s-a realizat prin instructaje pe grupele de lucru.

2. Analiza fizico-chimica a substratului energetic (zer). Stabilirea compozitiei mediilor de cultura (medii de multiplicare)

Analiza fizico-chimica a zerului s-a realizat prin metodele Munson-Walker si ICP-OES, evidentindu-se prezenta lactozei, a proteinelor functionale solubile, lipidelor, sarurilor minerale, compusilor cu azot neproteici (uree, acid uric), vitaminelor C si B. In vederea utilizarii ca substrat pentru cultivarea drojdiilor lactice zerul a fost purificat, in conditii de laborator, prin centrifugare, sterilizare si filtrare moleculara.

Pornind de la zerul dulce si acid, ca substrat pentru dezvoltarea drojdiilor lactice, s-au stabilit mai multe variante experimentale de medii de cultura simple si imbogatite cu diferite saruri minerale, in diferite concentratii si/sau cu „yeast extract”.

3. Caracterizarea microbiologica a materiei prime (zer) conform standardelor specifice produselor lactate

In paralel cu analiza fizico-chimica s-a efectuat si caracterizarea microbiologica a zerului liofilizat, dulce si acid (pentru prezenta/absenta enterobacteriaceelor, stafilococilor coagulazo pozitivi si Salmonellei), conform standardelor specifice produselor lactate, precizandu-se limitele

admise. In cazul zerului liofilizat s-a constatat absenta bacteriilor din genul *Salmonella*, dar si a bacteriilor coliforme, *E. coli*, Enterobacteriaceaelor si stafilococilor coagulaza pozitivi, iar numarul total de bacterii aerobe s-a estimat la 510 UFC/g. In cazul zerului proaspat, zerul dulce prezinta un grad de contaminare mai mare decat zerul acid, prezenta bacteriilor coliforme, stafilococilor coagulaza pozitivi, Enterobacteriaceaelor si a bacteriilor aerobe indicand susceptibilitatea zerului dulce la contaminarea microbiana, dar si gradul de igiena a procesului de obtinere.

4. Obtinerea de medii pentru conditionarea si conservarea prin liofilizare sau congelare in azot a tulpinilor de drojdii lactice adaptate

Pentru conditionarea si conservarea prin liofilizare a tulpinilor de drojdii lactice adaptate s-au folosit patru retete de medii, iar pentru conditionarea si conservarea prin congelare s-au preparat doua retete de medii. Ca mediu martor (fara zaharuri) s-a utilizat tampon fosfat salin. Flacoanele obtinute s-au etichetat si se pastreaza la +4°C.

5. Experimentari de laborator pentru obtinerea de drojdii lactice adaptate prin modificarea parametrilor tehnologici (temperatura, pH, aerare, dimensiune inocul) pornind de la tulpini parentale (*Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces marxianus marxianus*).

Primul parametru modificat a fost temperatura. Domeniile de temperatura testate, prin cultivarea drojdiilor pe medii selectate, au fost cuprinse in intervalul 28°C- 35°C. Valoarea pH-ului este, alaturi de temperatura, un parametru important in procesele de biosinteza. pH- ul testat a fost cuprins in intervalul 4-5. Ca si culturi starter pentru initierea dezvoltarii tulpinilor de drojdii s-au folosit diferite marimi de inocul si anume 3% si 5% din volumul total al culturii. In ceea ce priveste agitarea s-au testat valorile de 150 si 200 rpm si nu s-au observat cresteri semnificative ale cantitatii de biomasa si a procentului de substanta uscata.

In paralel s-a urmarit si influenta parametrilor de cultura asupra replicarii tulpinii de drojdie, clona Romvac.

6. Caracterizarea fenotipica si genetica a tulpinilor de drojdii lactice parentale s-a realizat prin inocularea acestora pe medii selective – MEA (Malt extract agar), Sabouraud Glucose Agar, Dg – 18 (Dichloran 18) in vederea stabilirii caracteristicilor culturale.

7. Conditionarea prin liofilizare sau imersie in azot lichid a tulpinilor de drojdii lactice adaptate; determinarea stabilitatii preparatelor rezultate prin teste de degradare accelerata si in timp real.

In urma liofilizarii au rezultat cate 70 flacoane din fiecare varianta de tulpini de drojdii lactice adaptate. Congelarea tulpinilor s-a facut pe doua cai: prin introducerea flacoanelor in congelator la -85°C ; prin imersie in azot lichid.

Determinarea stabilitatii preparatelor rezultate s-a facut prin teste de degradare in timp real si accelerat, atat la preparatele liofilizate cat si la cele congelate. Preparatele liofilizate sub protectia mediilor de liofilizare cu zaharuri sunt stabile la temperatura de degradare accelerata (3 sau 7 zile la 37°C), in timp ce la preparatul cu tampon fosfat salin se observa o reducere mare a concentratiei la 3 zile si pierderea totala a viabilitatii germenilor cand sunt mentinute la 7 zile la 37°C .

Metodele de conservare prin congelare sunt net superioare conservarii prin liofilizare. Nu exista diferente intre stabilitatea viabilitatii drojdiilor conservate la -196°C si -85°C .

8. Selectarea noilor tulpini de drojdii lactice adaptate, in functie de randamentul de transformare a materiei prime (zer) in biomasa proteica (levuriana).

Selectarea tulpinilor de drojdii lactice adaptate s-a facut atat in functie de procentul s.u. obtinut cat si de consumul lactozei din zer.

Pe baza rezultatelor inregistrate, cercetarile vor continua cu obtinerea de biomasa levuriana, prin optimizarea compozitiilor mediilor de cultura selectate in scopul izolarii oligozaharidelor.