

UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” GALAȚI  
FACULTATEA  
„ȘTIINȚA ȘI INGINERIA ALIMENTELOR”

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

**CERCETĂRI PRIVIND VALORIFICAREA  
BIOMASEI DE DROJDIE REZIDUALĂ  
DIN INDUSTRIA BERII**

**Coordonator științific**

**Prof. univ. Dr. Ing. GABRIELA ANTONETA STOICESCU**

**Doctorand**

**ing. GINA (CONSTANTIN) MARINESCU**

**GALAȚI 2011**

# CUPRINS

I. INTRODUCERE .....	9
II. STUDIU DOCUMENTAR .....	14
<b>1. Particularități citologice și biochimice ale drojdiei utilizate în industria berii</b> .....	15
1.1. Caractere morfofiziologice generale ale drojdiei <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> .....	15
1.1.1. Caractere morfologice.....	15
1.1.2. Caractere fiziologice generale.....	17
1.2. Compoziția chimică a drojdiei de bere.....	18
1.3. Procese metabolice ale drojdiei de bere cu aplicații industriale.....	19
1.3.1. Nutriția drojdiei de bere.....	19
1.3.1.1. Necesități nutritive și de dezvoltare.....	19
1.3.1.2. Medii nutritive industriale de cultivare a drojdiei de bere.....	21
1.3.1.3. Factori care influențează dezvoltarea drojdiei.....	22
1.3.2. Aspecte ale metabolismului drojdiei de bere.....	25
1.3.3. Multiplicarea și ciclul de viață al drojdiei de bere.....	28
1.3.4. Particularități ale degenerării drojdiei utilizate în industria berii.....	30
1.3.4.1. Caracteristici de îmbătrânire a drojdiei.....	30
1.3.4.2. Răspunsul drojdiei la factorii de stres.....	32
<b>2. Obținerea glucanilor din peretele celular al drojdiei</b> .....	34
2.1. Oportunitatea studierii glucanilor.....	34
2.2. Structura și compoziția chimică a peretelui celular .....	36
2.3. Particularități ale glucanilor din drojdie.....	39
2.4. Metode de fragmentare a celulei de drojdie și separare a peretelui celular.....	41
2.5. Procedee de obținere a glucanilor din drojdie.....	44
<b>3. Considerații practice privind valorificarea glucanilor</b> .....	49
3.1. Particularități senzoriale, fizico-chimice și microbiologice ale maionezelor.....	50
3.2. Aspecte privind caracteristicile reologice ale maionezelor.....	51
3.2.1. Comportamentul reologic al maionezelor.....	52
<b>4. Aspecte privind obținerea extractelor din drojdie</b> .....	54
4.1. Principii de bază privind obținerea extractelor de drojdie.....	54
4.2. Procedee de obținere a extractelor de drojdie.....	57
4.3. Obținerea extractelor de drojdie prin autoliză.....	60
4.4. Utilizarea extractelor de drojdie în industria alimentară.....	62
<b>5. Obținerea drojdiei îmbogățite cu seleniu</b> .....	63
5.1. Particularități ale elementului chimic – Seleniu.....	63
5.2. Aspecte privind metabolismul seleniului.....	65
5.2.1. Produse conținând seleniu cu importanță biologică.....	65
5.2.2. Absorbția și funcțiile seleniului în organismele vii.....	67
5.2.3. Căi metabolice ale compușilor seleniați.....	70
5.3. Oportunitatea studierii drojdiei seleniate.....	71
5.4. Procedee de obținere a drojdiei seleniate.....	74
III. REZULTATE EXPERIMENTALE.....	78
<b>6. Studii experimentale privind izolarea <math>\beta</math>-glucanului din peretele celular al drojdiei reziduale din industria berii</b> .....	79
6.1. Obiective științifice .....	79
6.2. Materiale și metode de analiză .....	80
6.2.1. Materiale.....	80
6.2.2. Metode de analiză și de prelucrare a datelor experimentale.....	82

6.2.3. Infrastructura de cercetare.....	99
6.3. Rezultate și discuții .....	100
6.3.1. Stabilirea unui procedeu de valorificare complexă a drojdiei reziduale .....	100
6.3.2. Pregătirea biomasei de drojdie de bere reziduală.....	102
6.3.3. Metode de obținere a $\beta$ -glucanului prin tratarea chimică a biomasei de drojdie reziduală.....	106
6.3.4. Metode de obținere a $\beta$ -glucanului bazate pe fragmentarea pereților celulari...113	
6.3.4.1. Studiul comparativ al metodelor de fragmentare și aprofundarea metodei de mărunțire cu bile.....	114
6.3.4.2. Obținerea $\beta$ -glucanului prin procedeu simplificat de tratare alcalină a peretelui celular.....	141
6.3.4.3. Calcularea randamentului de obținere a $\beta$ -glucanului prin procedeu simplificat.....	153
6.3.5. Studiul comparativ al metodelor de determinare a $\beta$ -glucanului din drojdia de bere reziduală.....	155
6.4. Concluzii parțiale .....	163
<b>7. Experimentări privind valorificarea compușilor din celula de drojdie reziduală .....</b>	<b>165</b>
7.1. Obiective științifice.....	165
7.2. Materiale și metode de analiză.....	166
7.2.1. Materiale.....	166
7.2.2. Metode de analiză .....	166
7.2.3. Infrastructura de cercetare .....	168
7.3. Rezultate și discuții. ....	169
7.3.1. Utilizarea $\beta$ -glucanului din drojdia reziduală ca înlocuitor de material gras în maioneze.....	169
7.3.1.1. Prepararea maonezelor cu $\beta$ -glucan.....	169
7.3.1.2. Analiza senzorială, fizico-chimică și microbiologică a maonezelor cu $\beta$ -glucan.....	170
7.3.1.3. Studiul reologic al maonezelor cu $\beta$ -glucan.....	176
7.3.2. Produse secundare obținute prin extragerea $\beta$ -glucanilor din drojdia reziduală .....	186
7.3.2.1. Extract de drojdie reziduală cu proprietăți de aromatizare.....	186
7.3.2.2. Reziduu celular pentru hrana animalelor.....	189
7.4. Concluzii parțiale .....	192
<b>8. Cercetări privind obținerea de biomasă de drojdie de bere reziduală îmbogățită în seleniu.....</b>	<b>193</b>
8.1. Obiective științifice.....	193
8.2. Materiale și metode de analiză.....	194
8.2.1. Materiale .....	194
8.2.2. Metode de analiză și interpretare a datelor experimentale.....	196
8.2.3. Infrastructura de cercetare .....	202
8.3. Rezultate și discuții. ....	203
8.3.1. Stabilirea unui procedeu de obținere a drojdiei seleniate din drojdie reziduală utilizând medii nutritive industriale .....	203
8.3.2. Studiul influenței unor factori de mediu asupra procesului de îmbogățire cu seleniu a drojdiei reziduale .....	206
8.3.3. Studiul capacității de multiplicare a drojdiei pe durata procesului de seleniere .....	219
8.3.4. Studiul modalității de încorporare a seleniului în celula de drojdie .....	229

8.3.5. Calcularea randamentelor specifice procesului de seleniere.....	236
8.3.6. Metode statistice de evaluare-interpretare a procesului de seleniere.....	243
8.4. Concluzii parțiale .....	252
<b>9. Schema bloc pe operații unitare de valorificare complexă a drojdiei de bere reziduale.....</b>	<b>254</b>
<b>10. Concluzii generale.....</b>	<b>255</b>
<b>11. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective.....</b>	<b>258</b>
<b>12. Diseminarea rezultatelor cercetărilor .....</b>	<b>259</b>
<b>13. Referințe bibliografice .....</b>	<b>260</b>
<b>Anexe .....</b>	<b>282</b>
Lista figurilor.....	282
Lista tabelelor .....	288
Cromatograme HPLC .....	290

## INTRODUCERE

Industria berii are la nivel mondial o evoluție pozitivă, berea fiind o băutură alcoolică atrăgătoare, consumată cu plăcere în majoritatea țărilor cu sau fără o tradiție în acest sens. Berea capătă importanță atât pentru valoarea nutritivă datorată compoziției chimice complexe (glucide, vitamine, substanțe minerale, compuși cu azot) cât și pentru conținutul relativ scăzut în alcool și valoarea sanogenetică a acesteia. Implicit, produsele secundare rezultate din procesul tehnologic de fabricare a berii, așa cum este drojdia de bere reziduală, ocupă un loc important din punct de vedere cantitativ necesitând preocupări permanente de valorificare.

În România, în trecut, o mare cantitate de drojdie reziduală era folosită în hrana animalelor. În prezent, o mulțime de ferme pentru creșterea animalelor au fost închise făcând disponibilă biomasa de drojdie reziduală care este deversată de multe ori în rețeaua de canalizare a orașelor.

Teza de doctorat cu titlul „ Cercetări privind valorificarea biomasei de drojdie reziduală din industria berii ” este motivată de următoarele considerente:

- celula drojdiei de bere este chiar și după scăderea capacității fermentative o reală și bogată sursă de beneficii pentru organismele vii datorită conținutului bogat în compuși biologic activi ;
- populația mondială, în continuă creștere, necesită căutarea permanentă a unor noi surse de hrană pentru omeni și obținerea unor produse alimentare și farmaceutice de calitate superioară ;
- valorificarea biomasei de drojdie reziduală ca alternativă la deversarea acesteia în rețeaua de canalizare a localităților reprezintă o reală măsură de protecție a mediului, o rezolvare eficientă a unei probleme de interes major a societății actuale ;
- o cantitate însemnată de drojdie de bere devenită inutilă în procesul tehnologic, după mai multe cicluri de fermentare, poate constitui o sursă profitabilă de venit pentru o fabrică și totodată pentru o ramură economică .

Din multitudinea de posibilități de valorificare a drojdiei reziduale, lucrarea de față și-a propus prioritar obținerea cât mai avantajoasă, eficientă, a unor compuși biologic activi extrem de valoroși în tratarea unor boli (chiar a cancerului) cum sunt  $\beta$ -glucanii din peretele celular al drojdiei și obținerea drojdiei îmbogățite cu minerale -drojdia seleniată -

cu rol incontestabil, în prevenirea și vindecarea unor grave afecțiuni și nu în ultimul rând a cancerului, utilizând medii nutritive industriale.

De asemenea, lucrarea propune obținerea unui extract de drojdie cu însușiri de aromatizare și totodată a unui reziduu celular util în hrana animalelor, ambele ca modalități de valorificare a componentelor remanente după izolarea glucanilor din peretele celulei de drojdie, pentru că s-a dorit, realmente, valorificarea completă a biomasei de drojdie de bere reziduală și, concomitent, folosirea în acest scop a unor semifabricate existente la nivel industrial.

În plus, prezenta lucrare propune o modalitate ușoară de utilizare în industria alimentară a produsului beta-gluconic rezultat din drojdia de bere reziduală, ca înlocuitor de material gras la prepararea maionezelor, în scopul obținerii unor produse cu un conținut redus de calorii.

Teza deschide noi perspective și poate prezenta interes pentru biotehnologie, industria alimentară, farmacie și medicină. Mai mult, cercetările au fost gândite cu aplicabilitate industrială, pentru a veni în sprijinul producătorului de bere din România.

Strategia de cercetare s-a realizat utilizând infrastructura modernă de cercetare aparținând următoarelor instituții:

- ❖ Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea „Dunărea de Jos” Galați, în special Platforma Bioaliment (Centru integrat de cercetare și formare pentru biotehnologie aplicată) dar și Laboratoarele de: Analize Fizico-Chimice și Microbiologice ale Alimentelor, Biochimie și Nanotehnologii în Analize de Mediu (Microscopie electronică);
- ❖ Institutul Național de Cercetare - Dezvoltare „Delta Dunării” Tulcea (determinarea seleniului din drojdie prin spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv - ICPMS);
- ❖ Facultatea de Horticultură din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară București (analiza cromatografică-HPLC a glucidelor și aminoacizilor);
- ❖ Fabrica de Bere „S.C. Martens S.A.” Galați.

Teza de doctorat este structurată în două părți, după cum urmează:

- **Studiul documentar**, prezintă sintetic, pe parcursul a cinci capitole, date din literatura de specialitate, cu referire la particularitățile drojdiei utilizate în industria berii și realizările pe plan național și mondial privind modalitățile de obținere a glucaților din peretele celular, a drojdiei seleniate, a extractelor de drojdie și a maionezelor cu beta-glucon.
- **Rezultate experimentale și contribuții**, prezintă rezultatele propriilor cercetări privind izolarea unor compuși biologic activi ( $\beta$ -glucanii) din celula de drojdie reziduală, valorificarea acestor compuși în industria alimentară la fabricarea maionezelor, obținerea unor extracte de drojdie cu proprietăți de aromatizare și a unui reziduu celular ca adaos în hrana animalelor și realizarea de biomasă de drojdie reziduală îmbogățită în seleniu.

Teza cuprinde 298 de pagini, în care sunt prezentate 64 de tabele și 169 de figuri și pentru realizarea tezei s-au analizat 316 referințe bibliografice, majoritatea publicații după anul 2000.

## PARTEA EXPERIMENTALĂ

### Cap. 6. Studii experimentale privind izolarea $\beta$ -glucanului din peretele celular al drojdiei reziduale din industria berii

#### 6.1. Obiective științifice

- elaborarea unui procedeu de valorificare complexă a drojdiei de bere reziduale;
- studii privind metodele de obținere a  $\beta$ -glucanului din celula de drojdie și optimizarea condițiilor de extracție a acestora din biomasa reziduală;
- cercetări referitoare la metodele de fragmentare a peretelui celular și studiu aprofundat al mărunțirii drojdiei reziduale la moara cu bile;
- calcularea randamentului de obținere a  $\beta$ -glucanului din drojdia reziduală;
- studierea obținerii  $\beta$ -glucanului în paralel din două generații de drojdie reziduală;
- studiul comparativ al unor metode de determinare a  $\beta$ -glucanului din drojdie;
- interpretarea datelor experimentale prin metode matematice de aproximare.

#### 6.2.1. Materiale

##### Microorganisme

În experimentări s-a utilizat drojdie de bere reziduală de fermentație inferioară tulpina *Saccharomyces carlsbergensis* (*Saccharomyces uvarum*), rezultată după mai multe cicluri de fermentație (drojdie de generație 4 și 6). Procesul de fermentare s-a desfășurat în unitancuri cilindro-conice, de mari capacități, sub cerul liber, în cadrul Fabricii de Bere S.C. MARTENS S.A. Galați.

##### Enzime și preparate enzimatic

1. *Glucozoxidaza fungică* standardizată (BELPAN GOX 10000) pentru dozarea enzimatică a glucozei la determinarea  $\beta$ -glucanului;
2. *Peroxidaza* pentru dozarea enzimatică a glucozei la determinarea  $\beta$ -glucanului;
3. *Amiloglucozidaza* (DIAZYME X4) pentru determinarea glicogenului ca etapă în determinarea  $\beta$ -glucanului;
4. *Amiloglucozidaza* (reactiv pur) pentru dozarea glucanilor ca fibre;
5. *Tenaza* ( $\alpha$  - amilaza) pentru determinarea beta-glucanilor ca fibre.

##### Reactivi

Kit de dozare a  $\beta$ -glucanului din drojdie „Yeast Beta-Glucan K-YBGL”

##### Alte materiale

*Agenți de plasmoliză* utilizați la ruperea pereților celulari în vederea extracției glucanilor:

- a. clorura de sodiu (reactiv) dar s-a testat și sarea ca ingredient alimentar;
- b. zahărul (minimum 99,8% zaharoză).

#### 6.2.2. Metode de analiză și de prelucrare a datelor experimentale

- Dozarea proteinelor solubile (Metoda Lowry)
- Dozarea acizilor nucleici din drojdie

- Dozarea glucidelor reducătoare prin reacția cu acidul 3,5-dinitrosalicilic (Metoda DNS)
- Dozarea glucozei prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC)
- Dozarea glicogenului din drojdie (Metoda Quain)
- Dozarea glucidelor totale (Metoda fenol-sulfurică)
- Dozarea enzimatică a glucozei (Metoda cu o - dianisidină)
- Dozarea beta-glucanilor din drojdie (Metoda Megazyme folosind kit-ul K-YBGL)
- Determinarea cenușii
- Dozarea proteinelor totale (Metoda Kjeldahl)
- Dozarea lipidelor (Metoda Soxhlet)
- Determinarea umidității drojdiei și a produselor derivate
- Determinarea viabilității celulelor de drojdie cu albastru de metilen
- Studiul morfologic al drojdiei prin microscopie cu scanare de electroni (SEM)
- Metode statistice de evaluare - interpretare a datelor experimentale

### 6.2.3. Infrastructura de cercetare

Cromatograf HPLC, microscop cu scanare de electroni, microscop cu epifluorescență, microscop binocular, spectrofotometru, liofilizator, aparat Fibertec, moară cu bile, analizor Kjeldahl, baterie Soxhlet, cuptor de calcinare, pH-metru, centrifugă cu refrigerare, baie de apă termostat, baie de ultrasunete, congelator Ultrafrizer, termobalanță, balanță analitică și tehnică, agitator shaker orbital, agitator magnetic, etuvă didactică, instalație de apă pură și ultrapură, mașină de fulgi de gheață, mixer Braun MR 4000, camera Thoma, micropipete automate.

## 6.3. Rezultate și discuții

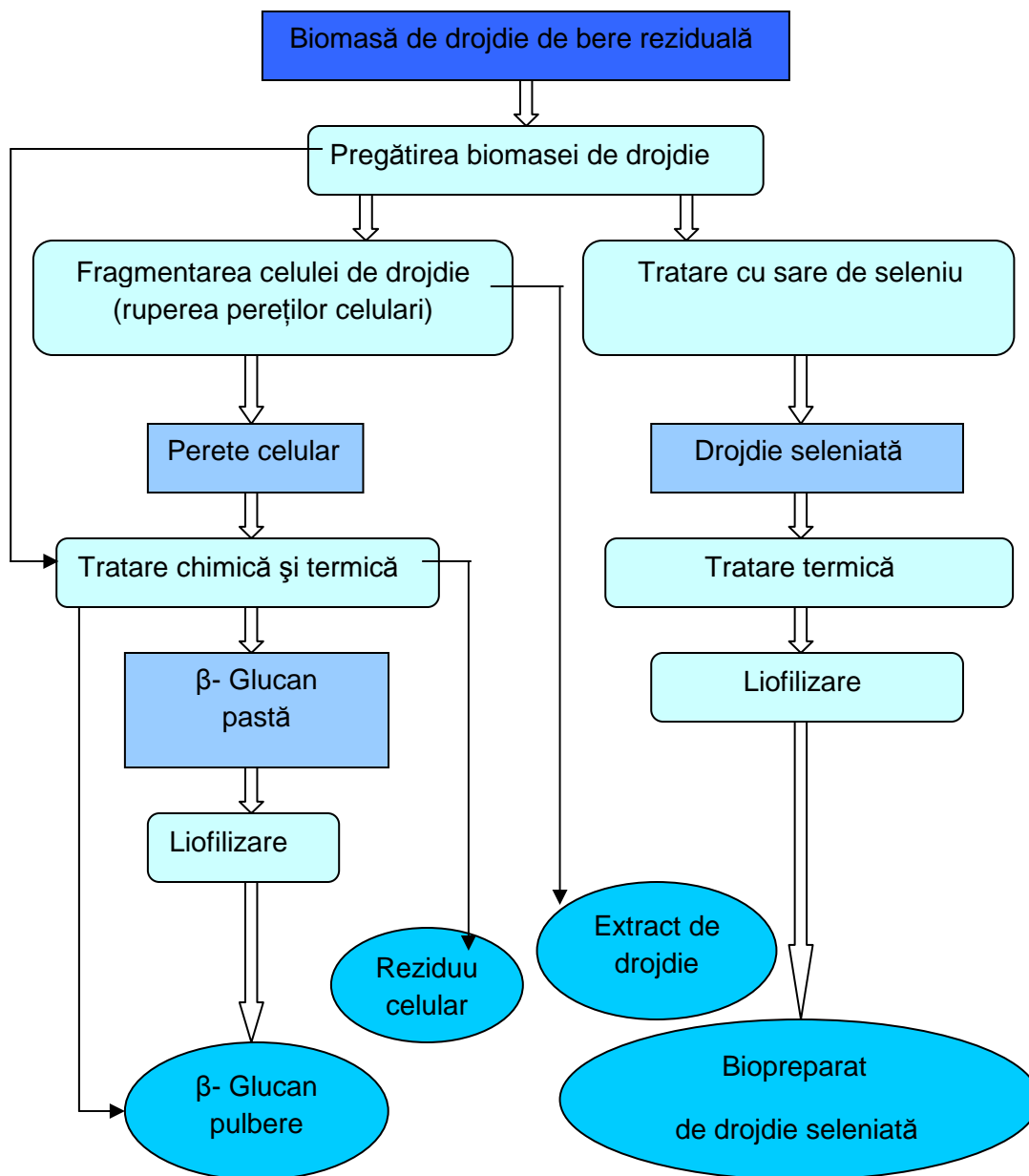
### 6.3.1. Stabilirea unui procedeu de valorificare complexă a drojdiei reziduale

Concretizarea obiectivelor de a valorifica la maximum biomasa de drojdie reziduală este reprezentată concis în figura 6.8 care cuprinde materia primă de la care s-a plecat în desfășurarea experimentelor (biomasa de drojdie de bere), produsele intermediare obținute (peretele celular,  $\beta$ -glucanul pastă, drojdia seleniată) și produsele finite principale ( $\beta$ -glucanul pulbere, drojdia seleniată pulbere) plus produsele finite secundare (extractul de drojdie și reziduul celular) realizate în urma experiențelor de laborator.

### 6.3.3. Metode de obținere a $\beta$ -glucanului prin tratarea chimică a biomasei de drojdie reziduală

Analizând studiile de specialitate privind procedeele elaborate pentru obținerea  $\beta$ -glucanilor din drojdie se poate constata că ele se pot grupa în două categorii:

- procedee care au la bază un tratament chimic al biomasei în vederea solubilizării și purificării  $\beta$ -glucanilor din celula de drojdie;
- procedee bazate pe fragmentarea pereților celulari urmată de extragerea și purificarea  $\beta$ -glucanilor.



**Figura 6.8.** Schema de valorificare complexă a biomasei de drojdie reziduală

Toate procedeele au ca principiu tratarea celulei de drojdie sau a peretelui celular cu soluții alcaline (în special hidroxid de sodiu) și soluții acide (îndeosebi acid clorhidric și acid acetic) pentru extragerea componentelor celulare existente în celulă sau perete celular (exceptând glucanii) urmată de separarea  $\beta$ -glucanului.

Din prima categorie s-au aplicat două metode de obținere a glucanilor din celula întreagă de drojdie de panificație (Jamás *et al.*, 1996; Jordan *et al.*, 2000) și s-a obținut  $\beta$ -glucan cu purități diferite din biomasa de drojdie de bere reziduală *Saccharomyces carlsbergensis*. Metoda Jordan *et al.* (2000) a constat în tratamente repetate cu: NaOH 3%; HCl 2,45M, 1,75M și 0,94M; alcool etilic absolut și mai multe încălziri până la fierbere urmate de repaus peste noapte cu decantare și în final, spălare cu apă, congelare și



liofilizare. S-a obținut  $\beta$ -glucan pulbere cu o puritate de 95,17% în cazul generației G6 și 95,88% în cazul generației G4 de drojdie reziduală. Randamentele de obținere a pulberii de  $\beta$ -glucan au fost: 2,5 (G6) și 2,8 (G4) g  $\beta$ -glucan/100 g biomasă. Metoda Jamas *et al.* (1996) a constatat în tratarea biomasei cu soluții de NaOH 3% și 4% la diferite temperaturi, corectare pH cu HCl, spălare cu alcool etilic sau eter etilic și numeroase spălări, centrifugări, finalizate cu uscarea la 37°C timp de 12h. S-a obținut  $\beta$ -glucan pulbere cu puritatea de 93,15% (G6) și 93,42 (G4) și un randament de 2,8 (G6) și 3,2 (G4) g  $\beta$ -glucan/100 g biomasă.

### 6.3.4. Metode de obținere a $\beta$ -glucanului bazate pe fragmentarea pereților celulari

Pentru a elimina operațiile multiple, timpul îndelungat și consumurile, specifice metodelor anterioare, în procesul de obținere a  $\beta$ -glucanului s-a introdus o nouă etapă, de fragmentare a peretelui celular. S-a creat astfel, în plus, posibilitatea valorificării unor compuși utili care nu se recuperează din soluțiile de tratare precedente.

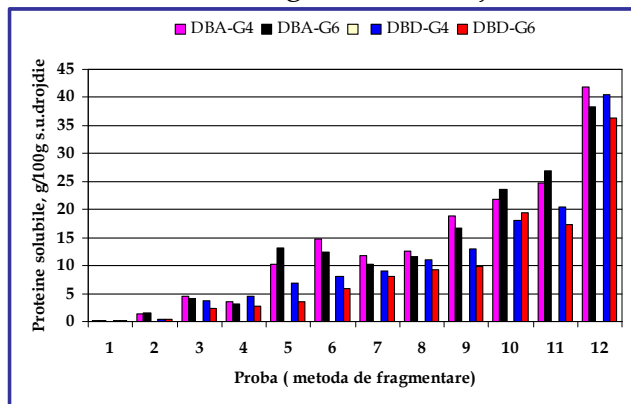
#### 6.3.4.1. Studiul comparativ al metodelor de fragmentare și aprofundarea metodei de mărunțire cu bile

Pentru ruperea sau degradarea pereților celulari s-au studiat comparativ opt metode de fragmentare mecanice și nemecanice: mărunțire cu mori cu bile, mojarare, fragmentare cu ultrasunete, congelare-decongelare, tratament alcalin, plasmoliză, termoliză, autoliză.

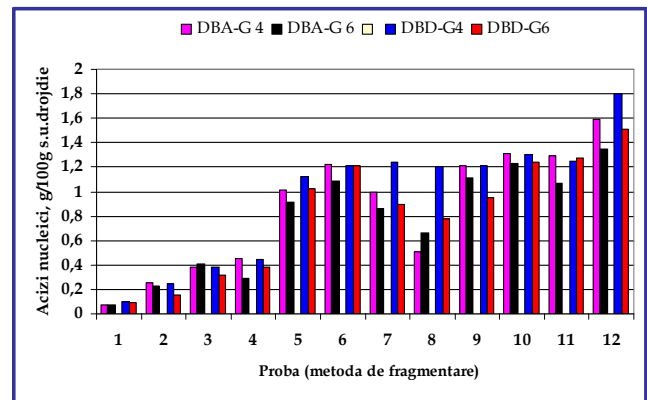
Eficiența metodelor de fragmentare s-a apreciat prin următoarele analize:

- examenul senzorial și analiza gravimetrică a sedimentului și a supernatantului, ca faze rezultate după centrifugarea biomasei fragmentate;
- determinarea proteinelor solubile prin metoda Lowry – pentru a stabili cantitatea de proteine eliberate în supernatant după fragmentare ;
- determinarea acizilor nucleici din supernatant ;
- determinarea viabilității celulelor de drojdie din sediment;
- studierea sedimentelor prin microscopie optică și electronică.

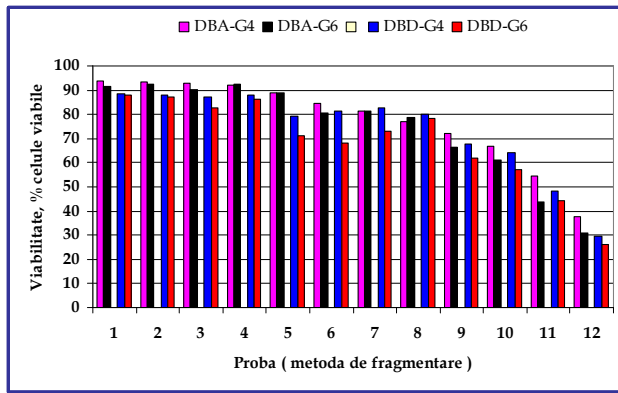
Rezultatele obținute după ruperea pereților celulari prin cele 8 metode sunt concretizate în figurile de mai jos.



**Figura 6.45.** Variația conținutului de proteine solubile din supernatante după fragmentare



**Figura 6.46.** Variația conținutului de acizi nucleici din supernatante după fragmentare

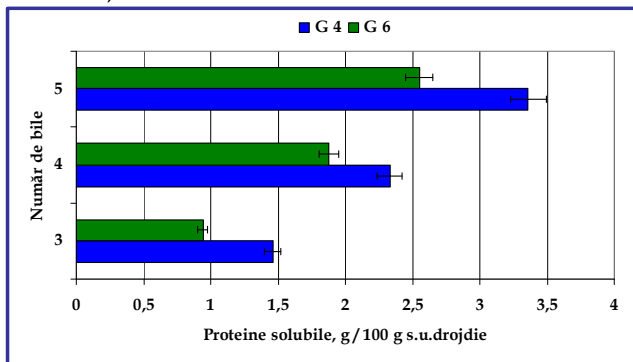


**Figura 6.47.** Viabilitatea probelor de drojdie după fragmentare

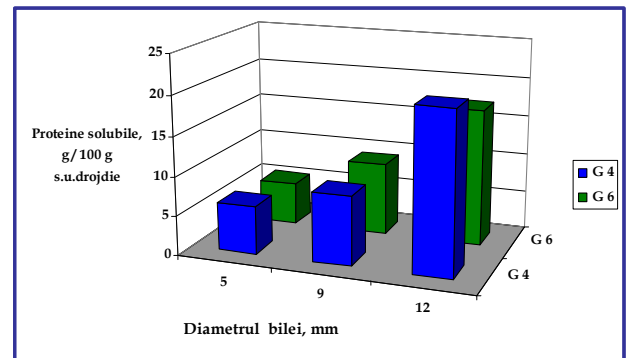
1. Proba de referință
2. Șoc termic la 70°C
3. Șoc termic la 100°C
4. Tratare cu ultrasunete
5. Plasmoliză cu NaCl 3 %
6. Plasmoliză cu NaCl 6 %
7. Plasmoliză cu zahăr 20 %
8. Congelare - decongelare
9. Mojarare
10. Tratament alcalin
11. Mărunțire cu bile
12. Autoliză

Cele mai bune rezultate au dat autoliza urmată de mărunțirea cu bile.

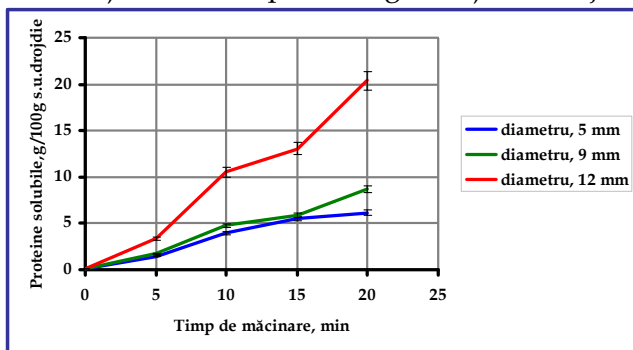
S-a efectuat un studiu aprofundat al mărunțirii la moara cu bile, de optimizare a condițiilor de lucru, în vederea obținerii unui efect maxim de rupere a peretelui celular. Au fost variați următorii parametri: diametrul bilelor, numărul bilelor, timpul de măcinare și frecvența de măcinare.



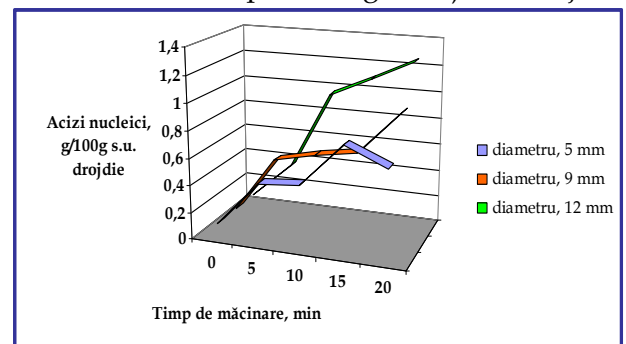
**Figura 6.19.** Influența numărului de bile cu diametrul de 12 mm asupra conținutului de proteine solubile, după 5 min de măcinare, la frecvența de 30 Hz, pentru 2 generații de drojdie



**Figura 6.20.** Influența mărimii bilei asupra conținutului de proteine solubile eliberate după 20 min de măcinare, la frecvența de 30 Hz, utilizând 5 bile, pentru 2 generații de drojdie



**Figura 6.21.** Efectul duratei de măcinare asupra conținutului de proteine solubile eliberate în supernatant pentru drojdia G 4, la frecvența de 30 Hz, utilizând 5 bile



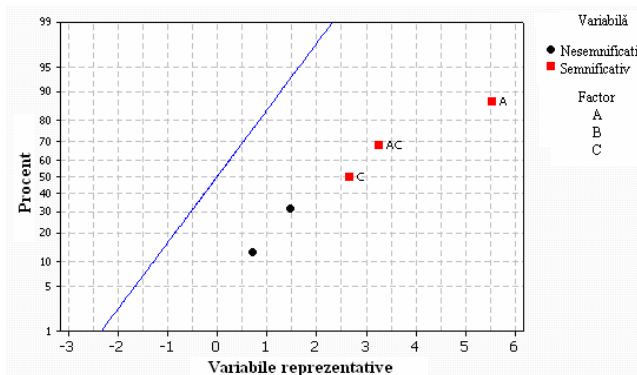
**Figura 6.24.** Efectul duratei de măcinare asupra conținutului de acizi nucleici eliberați în supernatant pentru drojdia G4 la frecvența de 30 Hz, folosind 5 bile

Varianta optimă a fost mărunțirea cu un număr de 5 bile de diametru 12 mm, timp de 20 min. la o frecvență de 30 Hz.

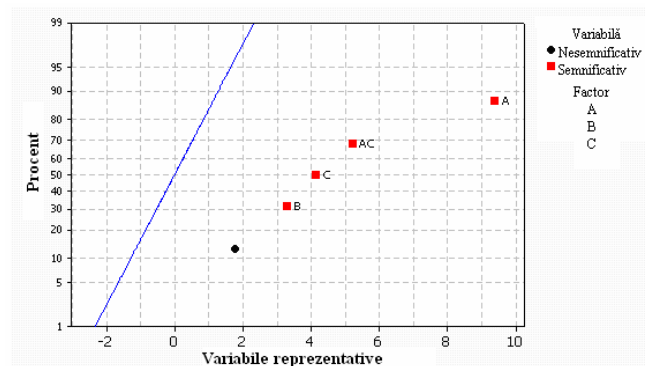
### Modelarea procesului de fragmentare cu bile

Pornind de la datele experimentale obținute în studiul fragmentării drojdiei s-a studiat posibilitatea aplicării unui model de optimizare a condițiilor de mărunțire a peretelui celular în moara cu bile, pentru două generații de drojdie reziduală G4 și G6, un model experimental de tip factorial fracțional, cu scopul de a verifica dacă rezultatele experimentului respectă regulile unui model matematic și pentru a stabili cu precizie în ce măsură parametrii aleși influențează procesul de fragmentare a drojdiei.

S-a aplicat un program de modelare cu trei variabile independente (3 factori) și s-a constatat că modelul ales ilustrează destul de bine procesul de rupere a pereților celulari.



**Figura 6.27.** Efectele diametrului bilei (A), nr. de bile (B), duratei măcinării (C) și a interacțiunii acestora asupra proteinelor drojdiei G4



**Figura 6.28.** Efectele diametrului bilei (A), nr. de bile (B), duratei măcinării (C) și a interacțiunii acestora asupra proteinelor drojdiei G6

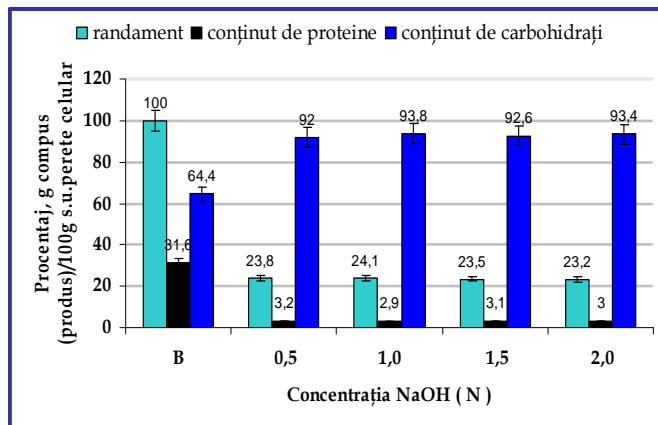
#### 6.3.4.2. Obținerea $\beta$ -glucanului prin procedeu simplificat de tratare alcalină a peretelui celular

Experimentul și-a propus găsirea celor mai bune condiții pentru obținerea unui preparat beta-glucanic prin tratarea peretelui celular, într-un singur pas, cu o soluție de NaOH de o anumită concentrație și într-un anumit raport drojdie : soluție NaOH, la o temperatură bine precizată și cu o durată bine controlată de menținere a peretelui celular în contact cu soluția bazică.

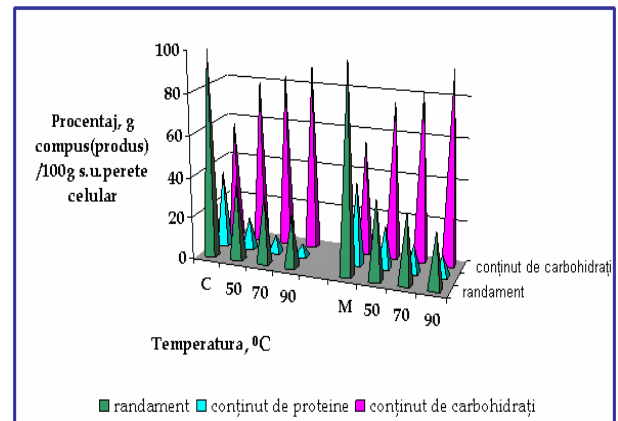
Tratamentul alcalin a fost aplicat peretelui celular rezultat prin autoliză respectiv mărunțire cu bile. Pentru a găsi condițiile optime de obținere a produsului „ $\beta$ -Glucan” cu puritate și randament cât mai mare, prin metoda simplificată, s-au aplicat mai multe variante de lucru. Condițiile optime de extracție pot fi rezumate la temperatura de 90 °C, concentrația 1 N a soluției de NaOH, timpul de extracție 1 h și raportul perete celular: soluție NaOH de 1: 5 pentru proba de perete celular obținut prin autoliză la temperatura de 50°C, timp de 48 h.

În figura 6.59 sunt trasate curbele de creștere a procentului de  $\beta$ -glucan respectiv scădere a procentului de proteine aparținând celor trei produse derivate din drojdie în condițiile optime de lucru. Se observă efectul mai puternic al autolizei de 48 h asupra

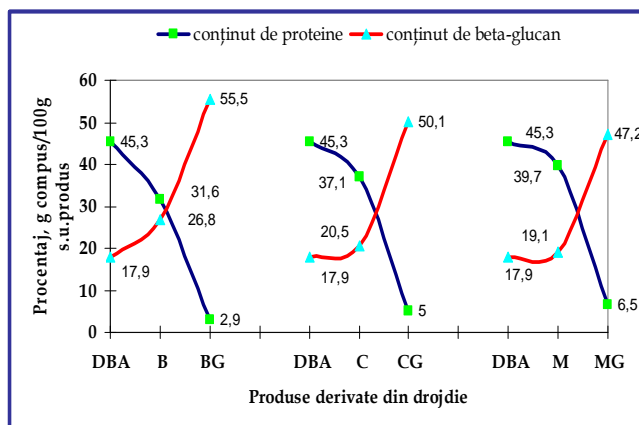
conținutului de glucan și proteine comparativ cu celelalte 2 metode. O rupere avansată a peretelui celular a condus la o extracție mai mare a proteinelor , într-un timp mai scurt.



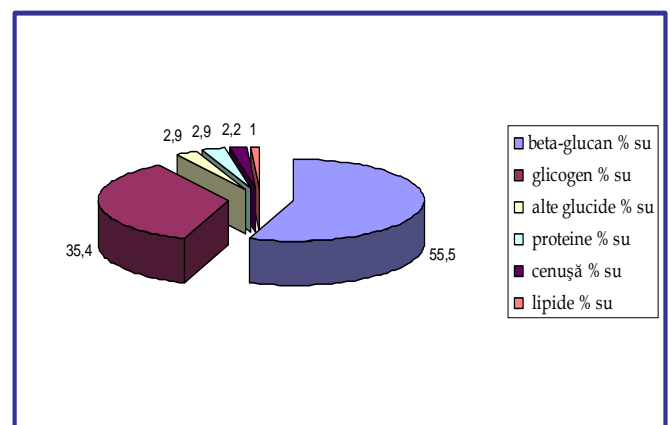
**Figura 6.52 .** Efectul concentrației soluției de NaOH asupra randamentului, a conținutului de proteine și a conținutului de carbohidrați din probele de perete celular B tratate în varianta II



**Figura 6.55.** Efectul temperaturii de extracție asupra randamentului, a conținutului de proteine și a conținutului de carbohidrați din probele de perete celular C și M tratate în varianta I ;



**Figura 6.59.** Evoluția conținutului de proteine și a conținutului de  $\beta$ -glucan din produsele derivate din drojdie pe durata procesului de preparare a  $\beta$ -glucanului în condițiile optime



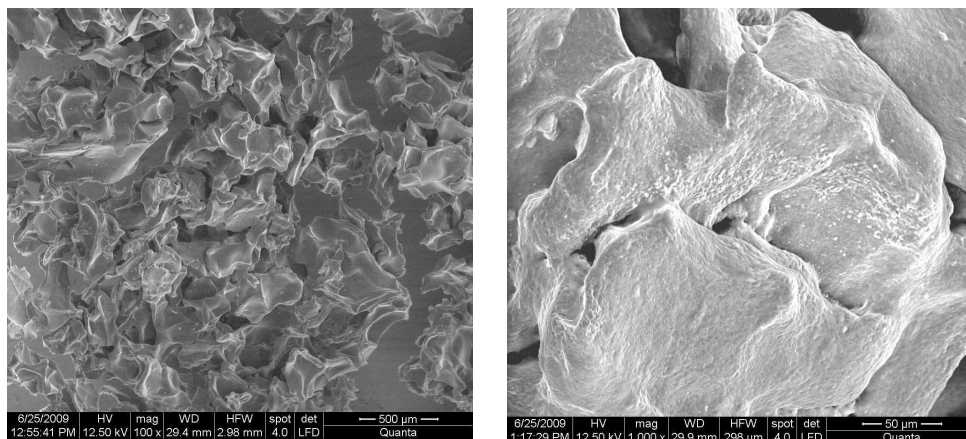
**Figura 6.60.** Compoziția chimică a produsului  $\beta$ -glucan pastă ,obținut în condiții optime, din perete celular rezultat după autoliză timp de 48 h, (g component/100g s.u.produs)

În urma tratamentului alcalin au rezultat trei produse denumite „ $\beta$ -Glucan pastă” (BG, CG, MG) caracterizate din punct de vedere senzorial și fizico-chimic astfel:

- pastă cu aspect lucios și consistență cremoasă de șarlotă, de culoare crem sau bej, care se desprinde de vas, fără miros ; după congelare pasta se denaturează ireversibil căpătând aspect floconat, de fulgi sau peleți și se separă apa;
- compoziția chimică raportată la s.u. este redată în graficele 6.60; 6.61; și 6.62;
- compoziția chimică raportată la 100 g produs este precizată în tabelul 6.19;
- textura produselor s-a studiat prin microscopie cu scanare de electroni.

**Tabelul 6.19.** Compoziția chimică a produselor  $\beta$ -Glucan pastă obținute în condiții optime , raportată la 100 g produs

Proba	Umiditate g %	$\beta$ -glucan g %	Glicogen g %	Alte glucide g %	Proteine g %	Lipide g %	Cenușă g %
<b>BG</b>	93,68	3,50	2,23	0,18	0,19	0,07	0,14
<b>CG</b>	93,27	3,37	2,42	0,34	0,33	0,07	0,16
<b>MG</b>	92,98	3,31	2,57	0,40	0,45	0,08	0,18



**Figura 6.63.** Produsul Beta -Glucan la o magnitudine de 100 x respectiv 1 000 x la un microscop cu scanare de electroni SEM QUANTA 200

### Aplicarea metodei ANOVA în studiul statistic al obținerii $\beta$ -glucanului prin metoda simplificată

Studiul statistic și-a propus să verifice dacă fiecare factor cauză din fiecare variantă de lucru pentru obținerea  $\beta$ -glucanului din peretele celular B are influență semnificativă asupra indicatorilor chimici ai produsului rezultat.

**Tabelul 6.15.** Aplicarea metodei ANOVA unifactorială la varianta 1

Grupe	Nr. de determinări	Suma	Media aritmetică	Variața
Coloana 1	5	204,4	40,88	637,937
Coloana 2	5	202,3	40,46	882,178
Coloana 3	5	211,7	42,34	1189,423

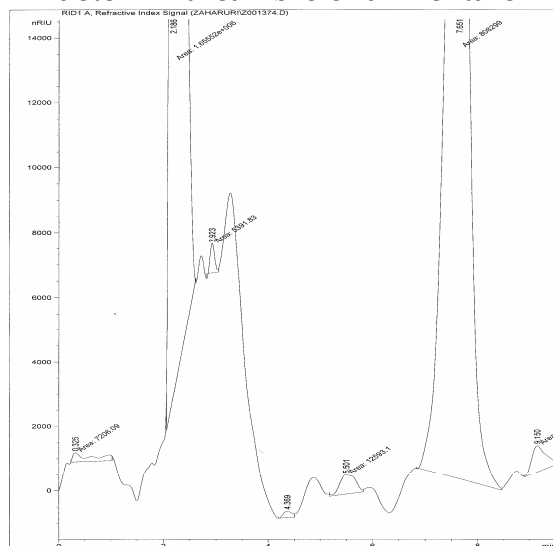
Sursa de variație	Componentele variației	Grade de libertate	Măsura variației	F	P-valoare	F critic
Intergrupe	9,737333	2	4,868667	0,005391	0,994626	3,885294
Intragrupe	10838,15	12	903,1793			
Total	10847,89	14				

Comparând valoarea calculată ( $F$ ) cu valoarea tabelată ( $F_{\text{critic}}$ ) a raportului „ $F$ ” se observă că  $F < F_{\text{critic}}$  și totodată valoarea factorului „ $P$ ” este superioară celei impuse (0,05) în toate cele patru variante de lucru. Aceste două constatări conduc la concluzia că ipoteza nulă se conservă ceea ce înseamnă că nu există diferențe semnificative între cele trei sau patru eșantioane corespunzătoare fiecărei variante.

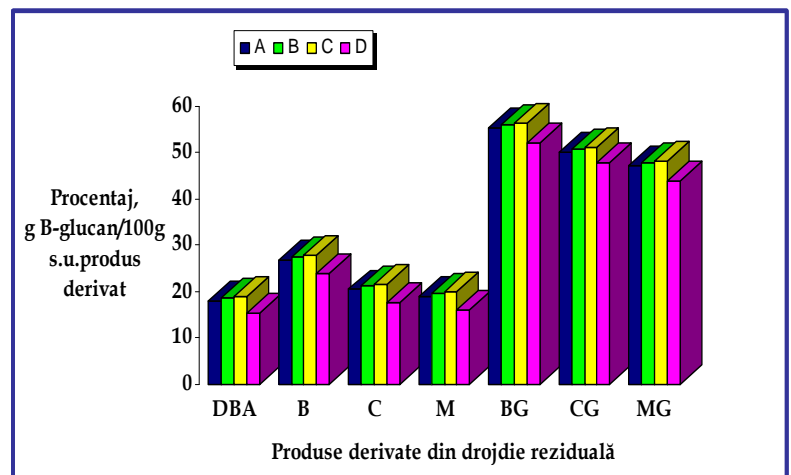
### 6.3.5. Studiul comparativ al metodelor de determinare a $\beta$ -glucanului din drojdia de bere reziduală

Pentru a avea o certitudine asupra corectitudinii rezultatelor finale, în vederea evaluării conținutului de  $\beta$ -glucan din biomasa de drojdie de bere reziduală G4, din peretele celular și din preparatele care conțin procente mai mari sau mai mici de  $\beta$ -glucan s-au aplicat și studiat comparativ, patru metode de determinare a  $\beta$ -glucanului:

- ✚ A. Determinarea  $\beta$ -glucanului prin scăderea conținutului de glucoză obținută din glicogen din conținutul total de glucoză al probei folosind metoda enzimatică de dozare a glucozei cu o-dianisidină
- ✚ B. Determinarea  $\beta$ -glucanului prin scăderea conținutului de glucoză obținută din glicogen din conținutul total de glucoză al probei folosind pentru dozarea glucozei metoda cromatografică cu lichide de înaltă performanță (HPLC)
- ✚ C. Metoda enzimatică de determinare a  $\beta$ -glucanului cu ajutorul kit-ului specific  $\beta$ -glucanului din drojdie K-YBGL (Kit Yeast Beta - Glucan)
- ✚ D. Determinarea glucanilor ca fibre prin metoda AOAC modificată pentru determinarea fibrelor alimentare



**Figura 6.66.** Cromatograma probei de glucoză totală din  $\beta$ -glucan BG (timp retenție 7,65 ; aria peak 808299)



**Figura 6.68.** Rezultatele comparative ale determinării conținutului de  $\beta$ -glucan din probele de drojdie și produse derivate prin metodele A, B, C, D.

## 6.4. Concluzii parțiale

1. S-a elaborat o schemă de valorificare complexă a biomasei de drojdie reziduală din industria berii care să conducă la obținerea a două produse beta-glucanice ( $\beta$ -Glucan pulbere și  $\beta$ -Glucan pastă), a unui extract de drojdie cu însușiri de aromatizare și a unui reziduu celular ca supliment furajer și obținerea unui biopreparat de drojdie seleniată.

2. În vederea pregătirii biomasei pentru extragerea  $\beta$ -glucanilor s-a efectuat fie o tratare a drojdiei cu o soluție de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  de diferite concentrații cu scopul dezamărării fie o spălare repetată a biomasei cu apă, obținând un randament în substanță uscată de 72-73% în cazul spălării și 61-63% în cazul dezamărării.
3. S-a dovedit că se poate obține  $\beta$ -Glucan din drojdie de bere reziduală, de fermentație inferioară, specia *Saccharomyces carlsbergensis*, de generație 4 sau 6 prin procedee laborioase de tratare chimică a biomasei, când rezultă produse beta-glucanice (de posibil uz farmaceutic) cu puritate 93-95% și randament 2,5-2,8% g  $\beta$ -glucan /100 g biomasă, sau prin procedee simplificate de tratare alcalină, într-un singur pas, a peretelui celular, când rezultă produse beta-glucanice cu puritate de 47-55% (de posibil uz alimentar) și randament 1,4%.
4. S-a realizat un studiu experimental al fragmentării drojdiei reziduale, aplicând opt metode de rupere a pereților celulari, din care autoliza urmată de mărunțirea cu bile au dat cele mai bune rezultate.
5. S-a efectuat un studiu aprofundat al mărunțirii drojdiei la moara cu bile (condiții optime: diametrul bilei 12 mm, număr de bile 5, durata 20 min., frecvența 30 Hz) și s-a demonstrat că datele experimentale obținute respectă regulile unui model matematic de optimizare.
6. S-au stabilit condițiile optime de izolare a  $\beta$ -glucanului prin procedeul simplificat: temperatura 90°C, concentrația 1N NaOH, durata 1 h și raportul probă : NaOH 1:5.
7. S-a efectuat un studiu comparativ al rezultatelor obținute prin extragerea  $\beta$ -glucanului din două generații de drojdie G 4 și G 6, înregistrându-se valori apropiate la toți indicatorii.
8. Studiind patru metode de determinare a  $\beta$ -glucanului din drojdie, s-a constatat că s-au obținut : cele mai mici valori ale conținutului de  $\beta$ -glucan prin metoda de determinare a fibrelor -AOAC modificată și cele mai mari valori prin metoda de determinare cu ajutorul kit-ului K-YBGL.
9. Prin modelare matematică și calcul statistic Anova s-a confirmat influența unor factori semnificativi asupra măcinării cu bile și în tratarea alcalină a peretelui celular, pentru obținerea  $\beta$ -glucanului.

## **Cap. 7. EXPERIMENTĂRI PRIVIND VALORIFICAREA COMPUȘILOR DIN CELULA DE DROJDIE REZIDUALĂ**

### **7.1. Obiective științifice**

- elaborarea unei rețete de preparare a maionezelor cu un conținut scăzut de calorii având  $\beta$ -glucanul ca înlocuitor de material gras;
- studiu referitor la influența  $\beta$ -glucanului asupra caracteristicilor senzoriale, fizico-chimice și microbiologice ale maionezelor;
- cercetări privind comportarea din punct de vedere reologic a  $\beta$ -glucanului ca ingredient al maionezelor;
- studii cu privire la obținerea unui extract de drojdie cu însușiri de aromatizare și a unui reziduu celular pentru hrana animalelor ca produse secundare obținute după separarea  $\beta$ -glucanului;
- calcularea randamentului de obținere a extractului de drojdie reziduală și a reziduuului celular.

### 7.2.1. Materiale

#### *Microorganisme*

Drojdie de bere reziduală dezamărată având caracteristicile din capitolul 6.

#### *Medii de cultură*

Mediul BCA (Bulion de carne cu agar) a fost utilizat pentru determinarea numărului total de germeni din maionezele obținute prin substituirea materialului gras cu  $\beta$ -glucan. Mediul BCA a fost sterilizat timp de 20 minute la temperatura de 115 °C.

#### *Alte materiale*

- a. Zahăr tos cristal utilizat ca adaos la obținerea extractelor cu însușiri de aromatizare
- b. Ingrediente pentru maioneză : preparat beta-glucanic pastă, gălbenuș de ou, ulei rafinat de floarea soarelui, sare iodată de masă, oțet alimentar din vin, muștar de masă, piper alb măcinat.

### 7.2.2. Metode de analiză

- Determinarea conținutului de grăsime din maioneze (Metoda Bligh și Dyer)
- Determinarea numărului total de germeni prin metoda Koch (Metoda culturală)

### 7.2.3. Infrastructura de cercetare

În plus de cap. 6 : Reometru, concentrator sub vid, centrifugă de laborator, etuvă controlată electronic, nișă microbiologică cu flux laminar, autoclav de laborator.

## 7.3. Rezultate și discuții

### 7.3.1. Utilizarea $\beta$ -glucanului din drojdia reziduală ca înlocuitor de material gras în maioneze

#### 7.3.1.1. Prepararea maionezelor cu $\beta$ -glucan

Dacă  $\beta$ -Glucanul pulbere cu 95% puritate poate fi folosit în scopuri farmaceutice, produsul  $\beta$ -Glucan pastă, de mai mică puritate, conținând în plus glicogen și o oarecare cantitate de proteine, poate fi utilizat în industria alimentară participând cu diferite roluri la compoziția unor alimente.

$\beta$ -Glucanul din drojdie are o mare vâscozitate, capacitate de reținere a apei, capacitate de legare a uleiului și de stabilizare a emulsiei și, în plus,  $\beta$ -glucanul este foarte puțin utilizat în tractul digestiv uman funcționând ca aliment non-caloric (Thammakiti *et al.*, 2004). Din aceste considerente acest produs poate fi propus și ca înlocuitor de material gras în maioneze și ca agent de îngroșare și de stabilizare a acestora.

S-au preparat astfel patru probe de maioneză de 200 g fiecare, notate:

- Z 0 - proba martor (fără  $\beta$ -glucan);
- Z 1 - proba în care  $\beta$ -glucanul a înlocuit 25% din ulei;
- Z 2 - proba în care  $\beta$ -glucanul a înlocuit 50% din ulei;
- Z 3 - proba în care  $\beta$ -glucanul a înlocuit 75% din ulei.

Rețetele de fabricație ale maionezelor sunt indicate în figura 7.1. În final, maionezele au fost împărțite în cantități egale și transferate aseptice în recipiente de sticlă sterile acoperite cu capac. Un set de probe a fost introdus în frigider la temperatura de 4 - 6°C (Z F), celălalt set a fost lăsat la temperatura camerei 25 - 30°C (Z C).

Noile produse preparate au fost caracterizate din punct de vedere senzorial, fizico-chimic, reologic și microbiologic.



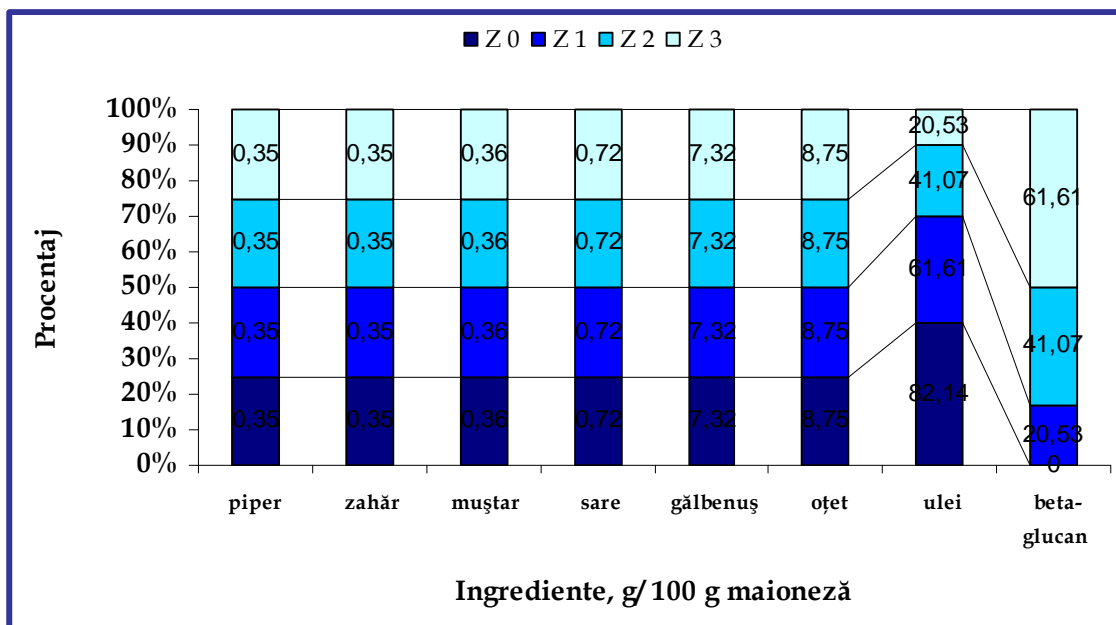


Figura 7.1. Rețetele de fabricație ale probelor de maioneză

### Analiza fizico-chimică și microbiologică

Tabelul 7.4. Compoziția chimică a probelor de maioneză

Proba	Umiditate, %, g/g	Grăsimi, %, g/g	Glucide, %, g/g	Proteine, %, g/g	Cenușă, %, g/g
Z 0	11,04	85,12	1,74	1,42	0,68
Z 1	30,31	64,34	3,10	1,51	0,74
Z 2	49,40	43,83	4,33	1,64	0,80
Z 3	68,06	24,05	5,31	1,73	0,85

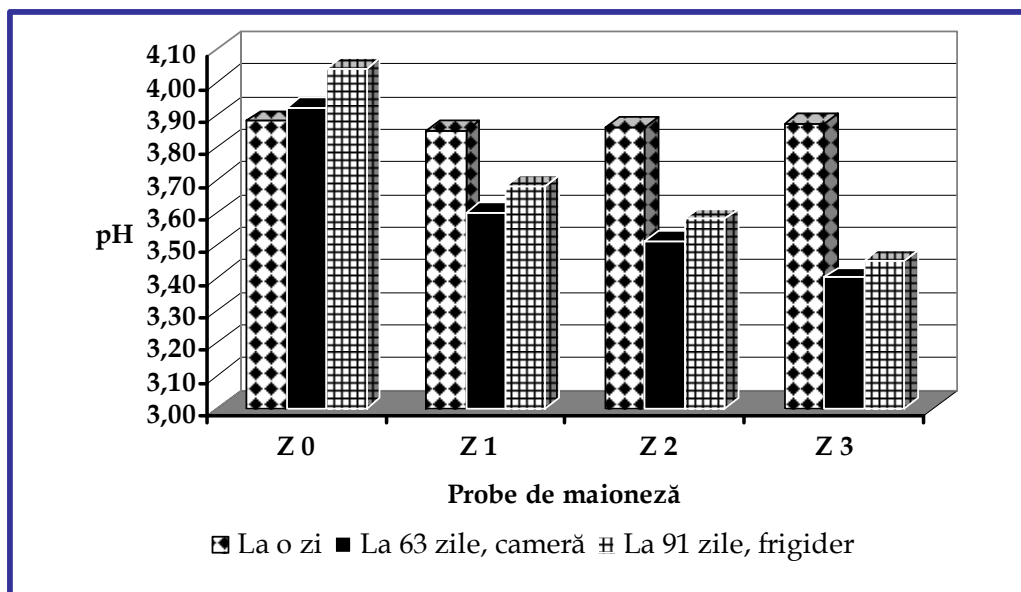
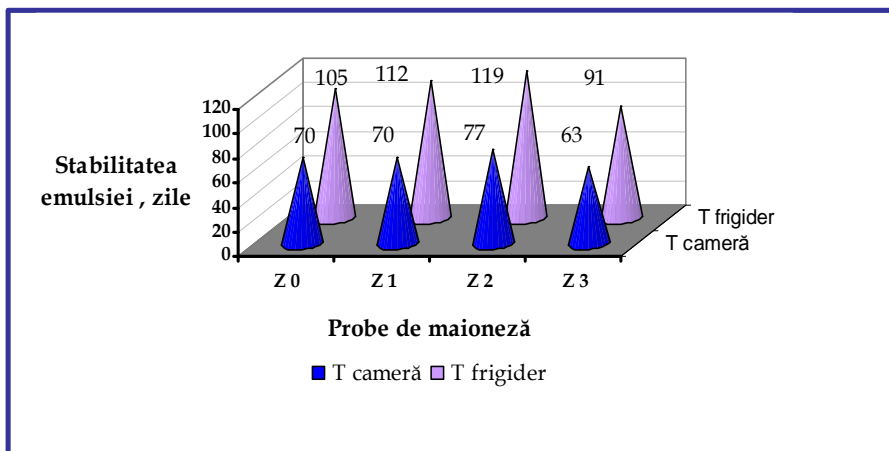
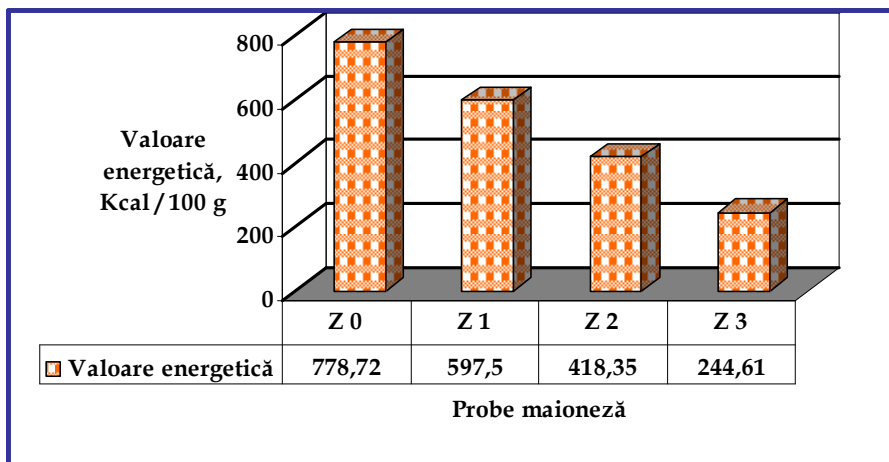


Figura 7.2. Evoluția pH-ului pe durata păstrării probelor de maioneză

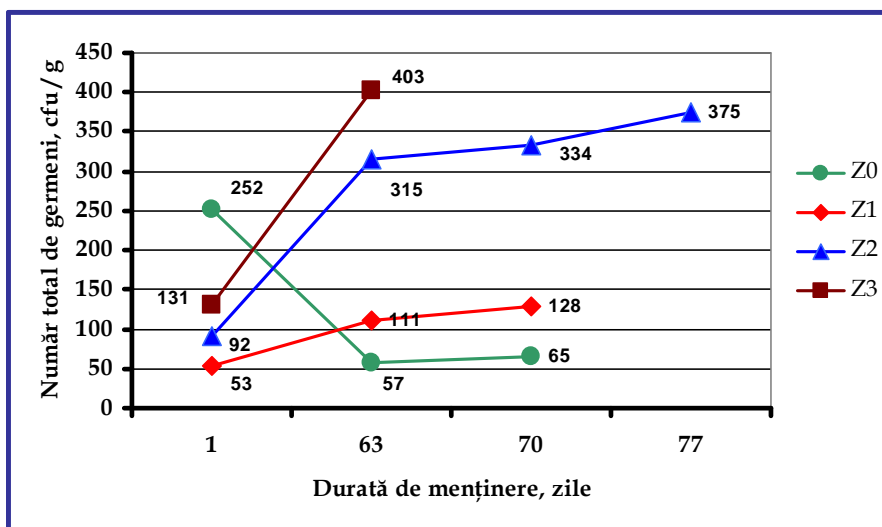


**Figura 7.3.** Stabilitatea probelor de maioneză la cald și la rece  
Cea mai mare stabilitate la cald o are proba Z2 cu 50%  $\beta$ -glucan (77 zile), urmată la egalitate de probele cu 25% și 0%  $\beta$ -glucan (70 zile), cea mai mică stabilitate având proba cu 75%  $\beta$ -glucan (63 zile).



**Figura 7.4.** Valoarea energetică a maionezelor cu  $\beta$ -glucan

Este vizibilă scăderea aportului de calorii, cu circa 24% a probei Z1 față de proba martor, cu 47% a probei Z2 și cu 70% a probei Z3.



**Figura 7.5.** Numărul total de germeni al probelor de maioneză păstrate la temperatura camerei  
După 63 de zile, NTG al probei Z0 descrește și crește NTG al celorlalte probe de circa 2 sau 3 ori. Reducerea încărcării microbiene a probei martor a fost, probabil, efectul solubilizării acidului acetic în faza uleioasă.

### 7.3.1.3. Studiul reologic al maionezelor cu $\beta$ -glucan

Au fost efectuate măsurători reologice cu reometrul AR 2000 Ex - TA Instrument CMT prevăzut cu un senzor de 40 mm diametru și unghiul conului de 2°. Toate probele au fost măsurate la 25°C și la o închidere de 0,05 mm.

Experimentul a constatat în aplicarea unor forțe de forfecare asupra celor patru probe de maioneză și urmărirea efectelor acestora.

S-a urmărit comportarea maonezelor la curgere din punct de vedere al următorilor indicatori: viteză de forfecare( $\dot{\gamma}$ ), tensiune de forfecare sau tensiune deformatoare( $\sigma$ ), vâscozitate dinamică( $\eta$ ), modul de depozitare (înmagazinare, stocare) a energiei  $G'$ , modul de pierdere a energiei  $G''$ , frecvență unghiulară și unghiul de fază „ $\tan \delta$ ”(  $G''/G'$ ) (funcție care caracterizează descrierea comportării vâscoelastice).

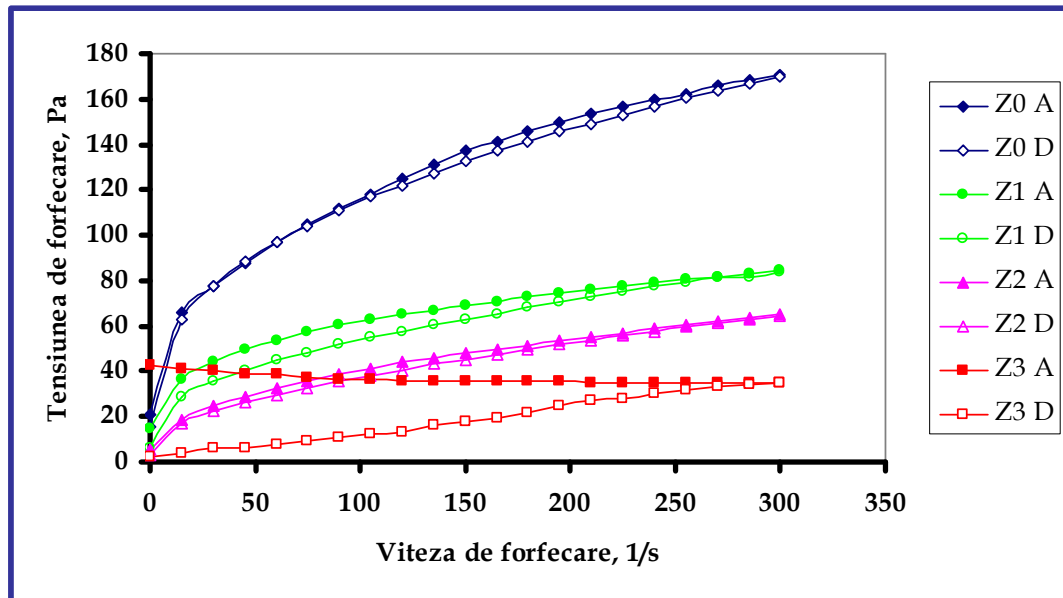


Figura 7.7. Curbele de curgere ale probelor de maioneză măsurate la 25°C.

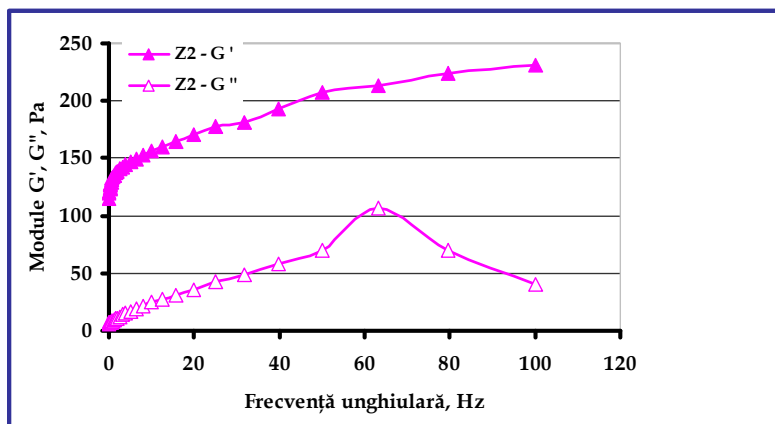


Figura 7.10. Spectrul mecanic dinamic al probei de maioneză Z2 măsurat la 0,5% deformare și 25°C

Un conținut de 50%  $\beta$ - glucan poate mări valoarea energiei stocate probabil datorită unei stabilizări a rețelei formate cu o cantitate mai mare de poliglucid, care poate fi astfel considerat un stabilizator.

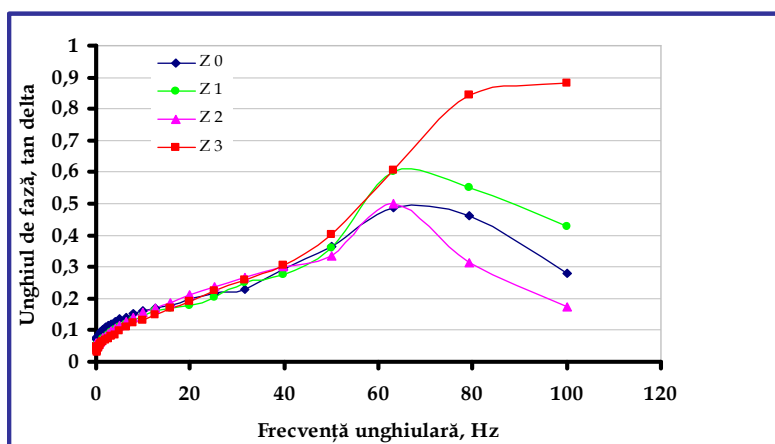


Figura 7.13. Unghiul de fază ( $\tan \delta$ ) al probelor de maioneză măsurat la 0,5% deformare și 25°C

Toate maionezele sunt foarte stabile având chiar valori suprapuse pe o mare parte din intervalul de frecvență studiat ; se diferențiază după 60 Hz când apar modificări majore ale unghiului de fază  $\tan \delta$ .

## Concluzii

Adăugarea  $\beta$ -glucanului în maioneză ca înlocuitor de material gras în diferite proporții afectează puțin culoarea și aspectul acesteia dar maioneza „light” obținută (cu un aport redus de calorii) reprezintă un bun aliment dietetic.

Numărul total de germeni al maionezelor este corespunzător standardelor în vigoare și a crescut în timp, atingând valori maxime în intervalul 375 - 405 cfu/g, după 77 zile de menținere la temperatura camerei și 119 zile la temperaturi de refrigerare.

Prin înlocuirea grăsimii în proporție de 25%, 50% și 75% cu  $\beta$ -glucan, maionezele obținute și-au păstrat caracterul de fluid newtonian cu o comportare tixotropică, pe întreg domeniul vitezei de forfecare 0- 300 s<sup>-1</sup>, dar cu mărirea vitezei de forfecare scade vâscozitatea tuturor probelor analizate. Calculând indicii de tixotropie al curbelor de curgere a maionezelor s-a constatat că proba cu 50%  $\beta$ - glucan prezintă cea mai mare stabilitate structurală iar proba cu 75%  $\beta$ - glucan are cea mai mică stabilitate, în intervalul de frecvență 0 - 100 Hz.

### 7.3.2. Produse secundare obținute prin extragerea $\beta$ -glucanilor din drojdia reziduală

#### 7.3.2.1. Extract de drojdie reziduală cu proprietăți de aromatizare

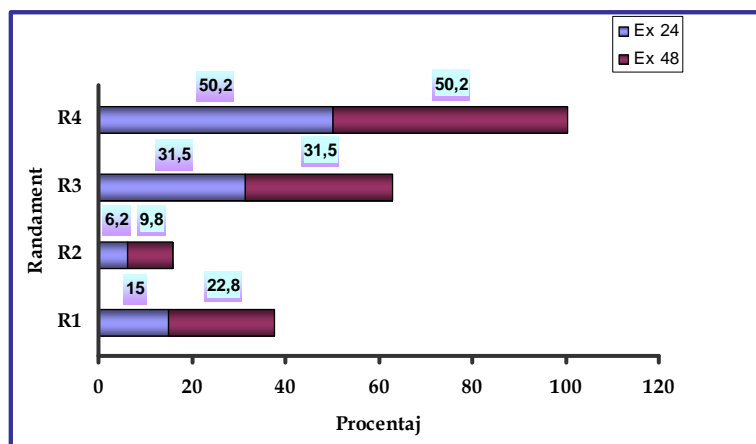
În urma procesului de autoliză lentă (24h sau 48h), necesară pentru obținerea peretelui celular, după centrifugare, a rezultat un supernatant destul de bogat în compuși nutritivi eliberați prin hidroliza cu enzime endogene. Valoarea acestui extract din drojdie a determinat propunerea unor modalități de valorificare, concretizate în folosirea acestuia ca:

- adaos al mediilor de cultură pentru microorganisme ;
- sursă de azot și vitamine pentru microorganisme în biotehnologie ;
- extract de drojdie cu însușiri de aromatizare după adăugare de zahăr ;
- sursă de 5' ribonucleotide utilizate ca potențiatori de aromă.

În prezentul studiu, s-a preparat un extract de drojdie cu însușiri de aromatizare (fig.7.18), având compoziția chimică prezentată în tab. 7.7 iar randamentele de obținere în fig. 7.19.

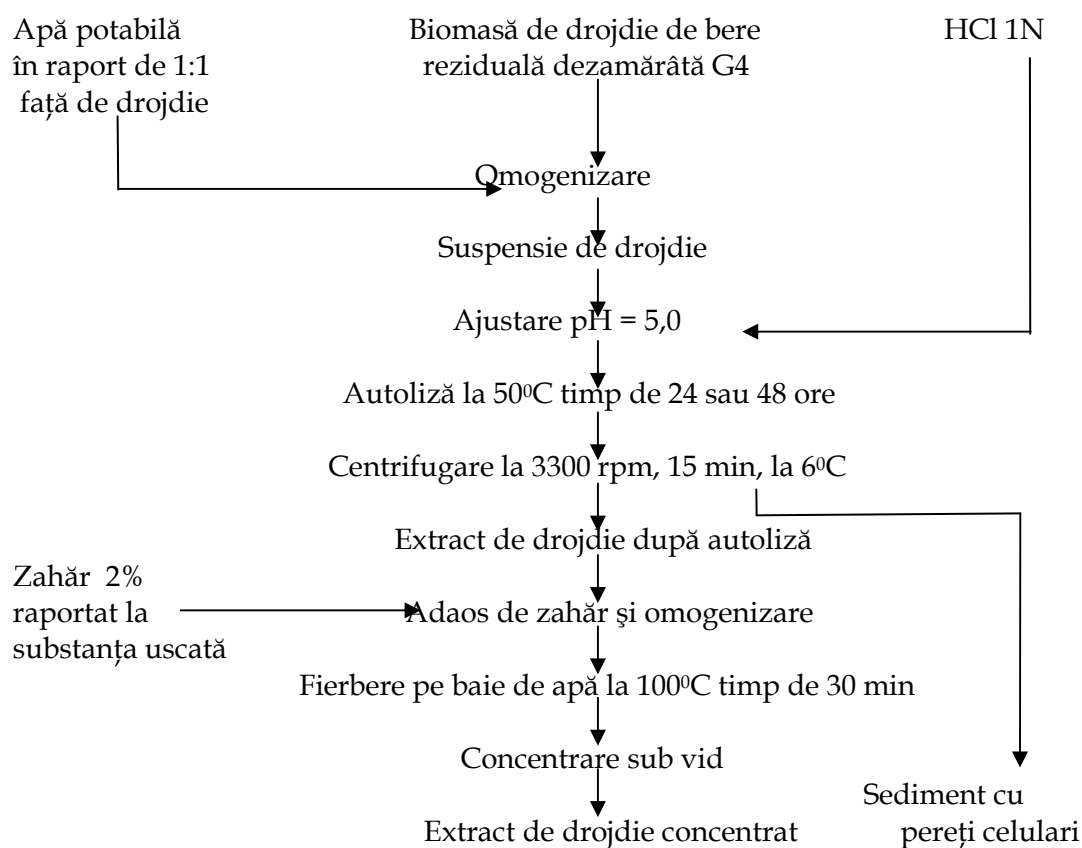
**Tabelul 7.7.** Compoziția chimică a extractelor obținute după extragerea glucanului

Proba	Proteine, % S.U.	Glucide, % S.U.	Lipide, % S.U.	ARN, % S.U.	Cenușă, % S.U.
Ex 24	68,64	19,49	0,63	3,29	7,85
Ex 48	70,43	16,5	0,75	3,55	8,62



**Figura 7.19.** Randamentele de obținere a extractelor de drojdie reziduală

R1-g extract concentrat/100g  
biomasă de drojdie reziduală  
R2-g extract liofilizat /100 g  
biomasă de drojdie reziduală  
R3 - g s.u. extract concentrat /100  
gs.u. biomasă de drojdie reziduală  
R4 - g s.u. extract liofilizat /100 g  
s.u. biomasă de drojdie reziduală



**Figura 7.18.** Schema de obținere prin autoliză a extractului de drojdie cu proprietăți de aromatizare

### 7.3.2.2. Reziduu celular pentru hrana animalelor

După tratarea peretelui celular cu soluție de NaOH de concentrație 1N în vederea obținerii  $\beta$ -glucanului, după centrifugare, se obține un supernatant (SN) în care se vor regăsi, în special, proteine extrase din peretele celular dar și unele glucide, lipide și acizi nucleici.

Supernatantele care conțin proteine sunt cele rezultate după prima centrifugare (C) sau prima spălare (S), pentru ambele probe B sau C, reprezentând perete celular obținut după 48 h, respectiv 24 h de autoliză.

Compoziția chimică le recomandă ca adaos de furajare în hrana animalelor (șrot).

**Tabelul 7.10.** Compoziția chimică a resturilor obținute din perete celular

Proba	Proteine, % S.U.	Glucide, % S.U.	Lipide, % S.U.	ARN, % S.U.	Cenușă, % S.U.
Șr 24 C	63,38	20,76	0,56	3,09	12,08
Șr 24 S	62,05	24,12	0,28	1,50	11,90
Șr 48 C	63,46	20,25	0,52	3,59	11,98
Șr 48 S	59,27	27,81	0,22	1,55	11,05

## Cap. 8. CERCETĂRI PRIVIND OBTINEREA DE BIOMASĂ DE DROJDIE REZIDUALĂ ÎMBOGĂȚITĂ ÎN SELENIU

### 8.1. Obiective științifice

- elaborarea unui procedeu de îmbogățire a drojdiei reziduale cu seleniu și optimizarea condițiilor de seleniere;
- studii privind influența factorilor de mediu asupra procesului de acumulare a seleniului în celula de drojdie;
- cercetări referitoare la utilizarea unor medii nutritive industriale (mustul de malț și apele de spălare a borhotului) pentru cultivarea drojdiei reziduale în vederea selenierii;
- studierea influenței seleniului din mediul nutritiv asupra capacității de multiplicare a drojdiei pe durata procesului de seleniere;
- studiul modalității de legare a seleniului de celula levuriană;
- calcularea randamentului de metabolizare a seleniului și de transformare a biomasei în drojdie seleniată;
- interpretarea datelor experimentale prin metode statistice.

### 8.2.1. Materiale

#### *Microorganismele*

Drojdie de bere reziduală nedezamărată (G5), cu caracteristici senzoriale inferioare drojdiei utilizate în cap. 6 (culoare cafeniu închis, aspect de suspensie mult mai fluidă, cu umiditate mult mai mare).

#### *Medii nutritive*

##### 1. Mustul de malț

Pentru ca rezultatele experimentale să conducă în final la o soluție ușor de aplicat în practică, la nivel industrial, s-au creat condiții de lucru cât mai apropiate de cele uzinale și s-au utilizat materii prime existente în fabrica de bere - must de malț fără hamei din cazanul de fiert și ape de spălare a borhotului din cazanul de filtrare.

**Tabelul 8.3.** Caracteristicile mustului de malț industrial utilizat

Caracteristica	Valoare
Extract primitiv	11 grade Plato
pH	5,5
Culoare	6,2 unități EBC
Aciditate	1,1 mL NaOH 1N la 100 mL must
Rețetă de fabricație	75 % malț, 25 % porumb

##### 2. Apele de spălare a borhotului

Sub denumirea de „ape de spălare” sunt privite porțiunile de apă caldă, care se recuperează la epuizarea borhotului din cazanul de filtrare a plămezii de malț. Conținutul în extract al acestor ape a fost de 6 %. Apele de spălare reprezintă un mediu nutritiv sărac pentru dezvoltarea drojdiei în vederea selenierii dar s-a propus utilizarea lor, pentru a compara capacitatea de absorbție a seleniului în medii diferite și pentru încercarea de valorificare a lor ca produs rezultat din procesul de fabricare a berii.

### 3. Mediu de cultură pentru drojdi

S-a preparat și sterilizat în laborator mediul Wickerham, specific drojdiei de bere.

*Alte materiale*

#### Selenitul de sodiu.

#### 8.2.2. Metode de analiză

- Determinarea seleniului din drojdie prin spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP - MS)
- Determinarea aminoacizilor liberi prin cromatografie HPLC
- Determinarea maltozei prin reacția cu acidul 3,5 -dinitrosalicilic (Metoda DNS)
- Determinarea concentrației de celule de drojdie din medii lichide (Metoda spectrofotometrică)

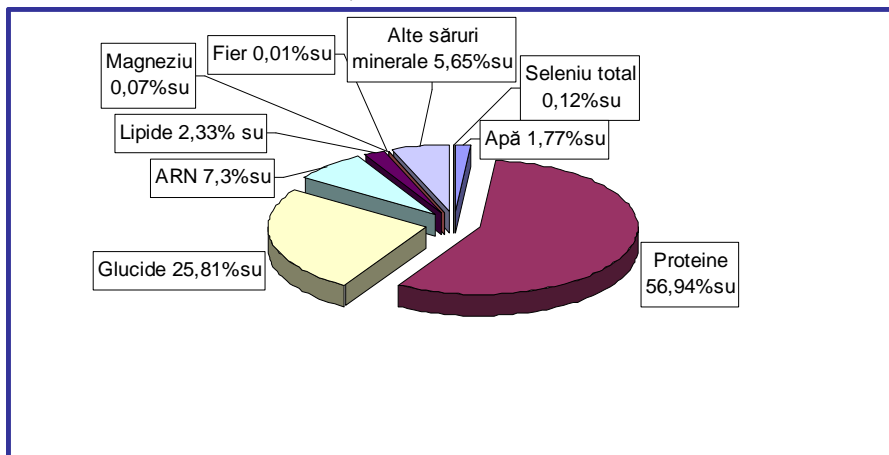
#### 8.2.3. Infrastructura de cercetare

În plus de cap. 6 și 7 : spectrometrul ICP-MS, refractometru portabil, zaharometru.

### 8.3. Rezultate și discuții

#### 8.3.1. Stabilirea unui procedeu de obținere a drojdiei seleniate din drojdie reziduală utilizând medii nutritive industriale

Cunoscând tehnica obținerii drojdiei seleniate pornind de la cultura pură de drojdie de panificație *Saccharomyces cerevisiae*, cultivată în medii nutritive preparate în laborator (Nagodawithana *et al.*, 1985; Suhajda *et al.*, 2000; Varga, 2003; Kaur și Bansal, 2006; Ioniță *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2009), în prezenta lucrare experimentală, s-au studiat posibilitățile de îmbogățire cu seleniu a drojdiei de bere *Saccharomyces carlsbergensis* – biomasă reziduală, cultivată în medii nutritive industriale. A fost monitorizată influența mai multor factori asupra cantității de seleniu încorporată, stabilindu-se condițiile optime de acumulare a mineralului, s-a verificat modalitatea de legare a acestui semimetale de celula drojdiei, s-a urmărit capacitatea de multiplicare a celulelor pe durata selenierii și s-a calculat randamentul de metabolizare a seleniului și de transformare a substratului în biomasă de drojdie îmbogățită în seleniu. Procedeu adoptat de obținere a drojdiei seleniate este prezentat în fig. 8.7. Produsul obținut a fost liofilizat, rezultând în final pulbere de drojdie seleniată având compoziția chimică prezentată în fig. 8.8.



**Figura 8.8.** Compoziția chimică a drojdiei seleniate pulbere (g component / 100 g s.u. drojdie).

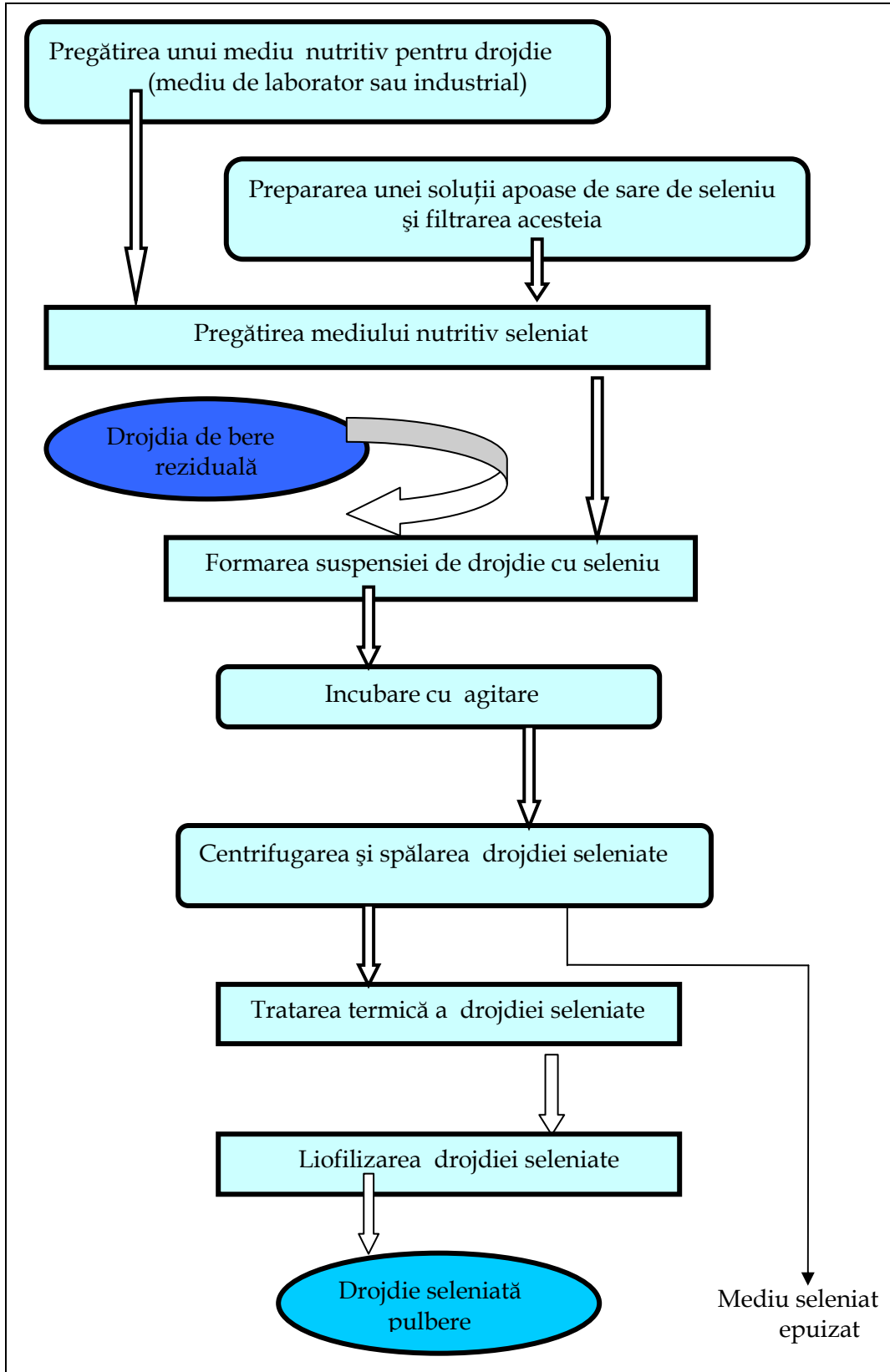


Figura 8.7. Schema operațiilor de obținere a drojdiei seleniate



### 8.3.2. Studiul influenței unor factori de mediu asupra procesului de îmbogățire cu seleniu a drojdiei reziduale

#### Influența temperaturii și a concentrației de seleniu asupra procesului de seleniere

Din figura 8.9 se deduce capacitatea de absorbție a drojdiei la temperatura de 20°C sau 30°C, când este cultivată în mediul Wickerham (W), must de malț (M) sau ape de spălare (A), la diferite concentrații de selenit în mediu (CSeI). La 30°C comparativ cu 20°C, SeT la CSeI 30 ppm a crescut cu 48,7% (W), cu 65,2% (M) și cu 72,1% (A).

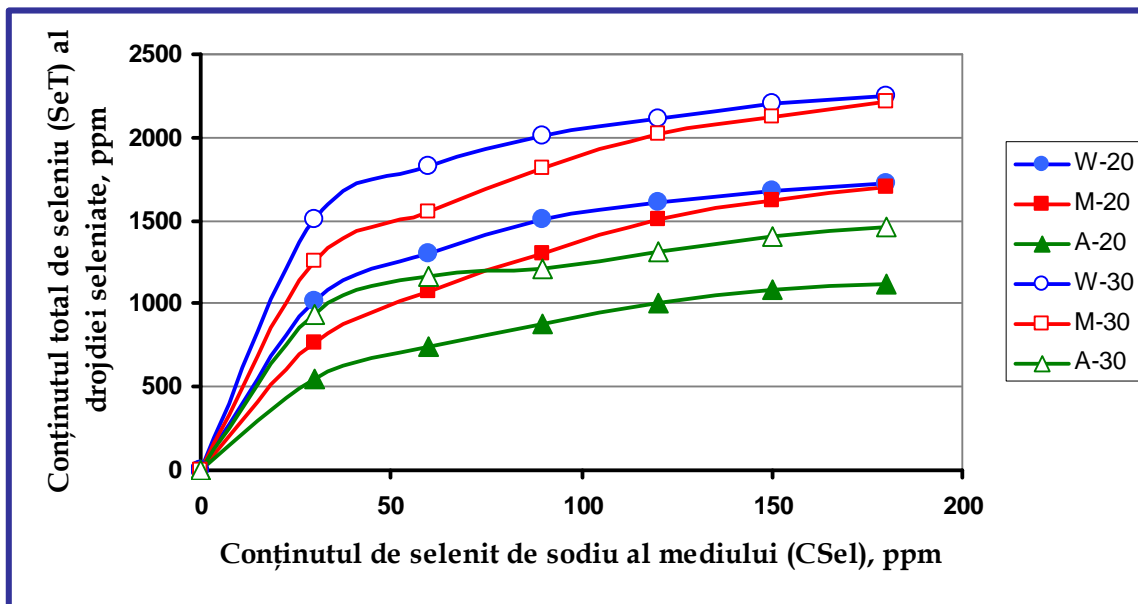


Figura 8.9. Variația conținutului total de seleniu al drojdiei seleniate la temperatura de 20°C și 30°C după 24 h, pentru trei medii nutritive cu 2% biomasă și o concentrație de 0-180 ppm  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

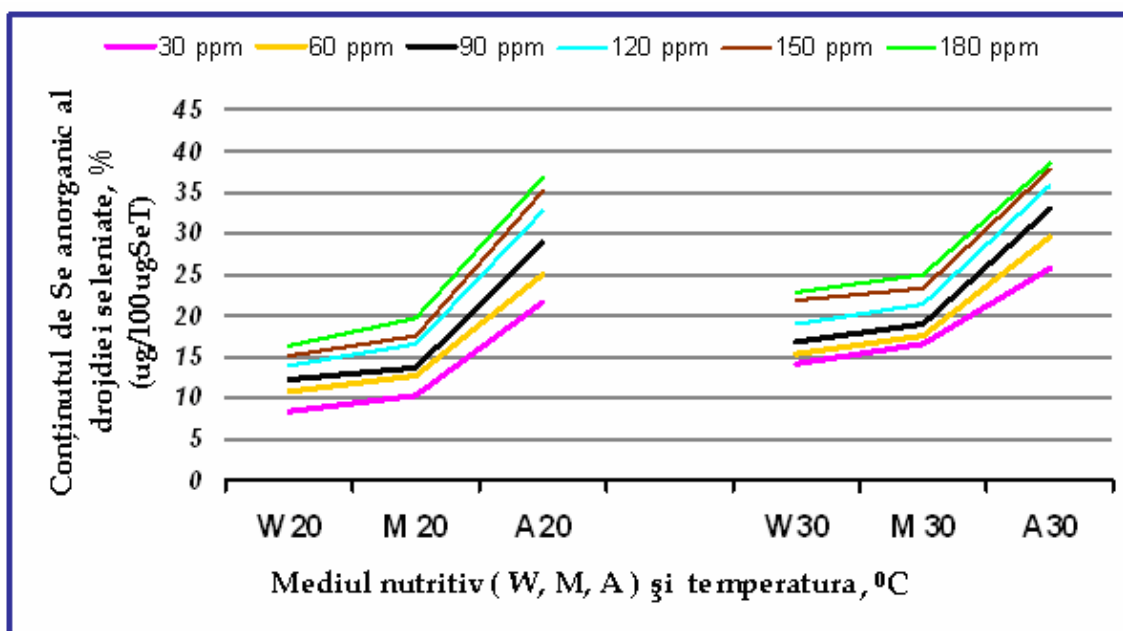
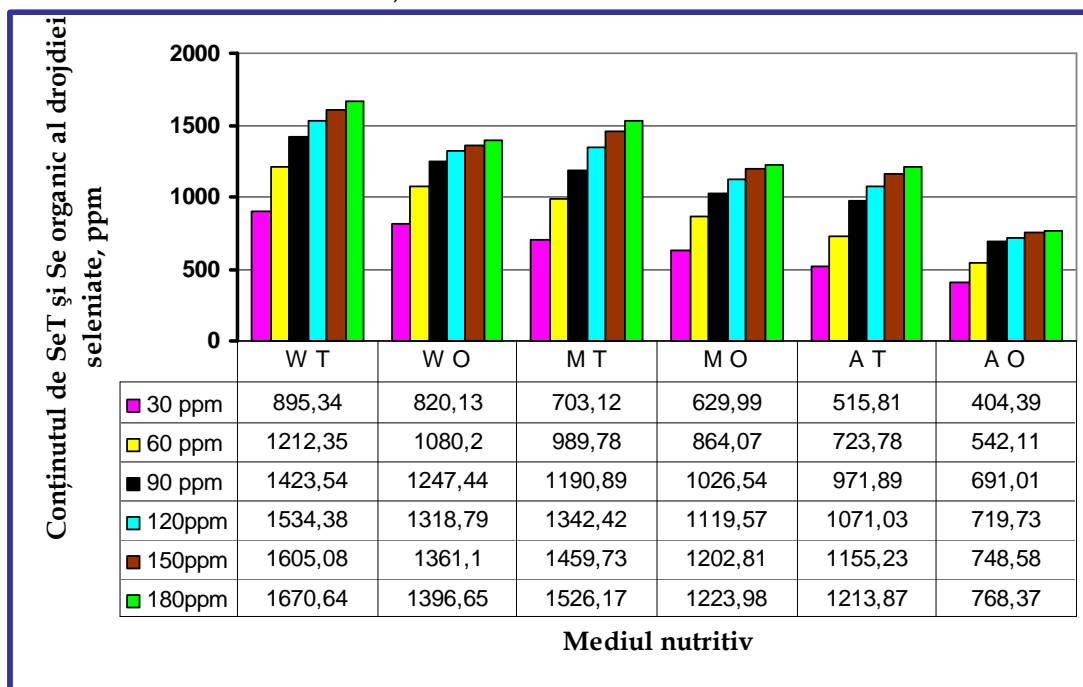


Figura 8.12. Variația conținutului de seleniu anorganic al drojdiei seleniate la temperatura de 20°C și 30°C, după 24 h, pentru trei medii nutritive, cu 4% biomasă și concentrația 30-180 ppm  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

## Influența mediului și a concentrației de seleniu asupra procesului de seleniere

Luând în considerare faptul că Se legat organic este mai bine asimilat de organismul uman decât cel anorganic, s-a urmărit în continuare și evoluția Se organic, în funcție de aceiași factori care au fost studiați și la Se total.



**Figura 8.13.** Variația conținutului total de seleniu și al seleniului organic al drojdiei seleniate pentru 3 medii cu 4% biomasă, după 24 h, la 20°C și concentrația 30-180 ppm  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$   
WT , WO, MT, MO, AT, AO – conținut de Se total respectiv Se organic al drojdiei din mediul Wickerham, must , ape de spălare

Se constată că mediul Wickerham asigură condiții optime de asimilare a Se de către drojdie, atât prin necesarul de hrană cât și prin substratul glucidic asigurat.

Pe măsura creșterii Csel, scade și proporția de Se organic, mult mai drastic în cazul apelor de spălare. La o creștere a Csel de 6 ori, Se total crește de 2,3 ori iar Se organic din ape crește doar de 1,9 ori, ceea ce dovedește inutilitatea suplimentării apelor de spălare cu cantități prea mari de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .

## Influența proporției de biomasă de drojdie și a concentrației de seleniu asupra procesului de seleniere

Din figura 8.15 se constată că pe măsura creșterii procentului de biomasă de la 2% la 10%, SeT scade cu 12,7% (M) și cu 24% (A), la Csel 30 ppm și scade cu 13,5% (M) și crește cu 2,6% (A) la Csel 180 ppm.

În cazul apelor, un extract mai mic, în același interval de timp poate fi consumat mai rapid, lăsând loc, probabil, mai mult unui proces adsorbativ, care nu mai respectă regulile procesului de acumulare din mediul cu extract mai mare, astfel încât SeT crește, datorită unei cantități mai mari de Se anorganic.

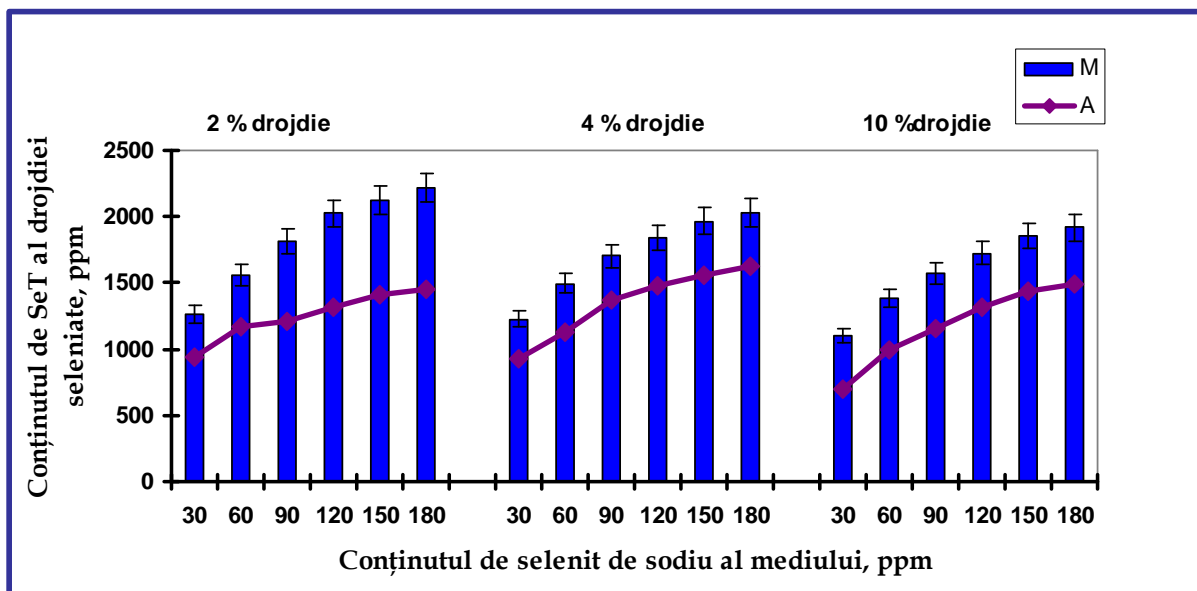


Figura 8.15. Variația conținutului total de seleniu al drojdiei seleniate pentru 2 medii industriale cu 2, 4,10% biomasă, după 24 h, la temperatura de 30°C și o concentrație de 30-180 ppm  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

### Influența duratei de cultivare a drojdiei și a concentrației de seleniu asupra procesului de seleniere

SeT după 24 h a fost mai mare decât SeT după 12 h, cu 40,5% (M) și 38,5% (A), la Csel 30 ppm, ceea ce arată că în timp, viteza de acumulare se menține aproximativ constantă în ambele medii. La Csel de 6 ori mai mare, SeT în 24 h crește de 1,7ori (M) și 2,1 ori (A) iar în 12 h crește de 1,6 ori (M) și 2 ori (A).

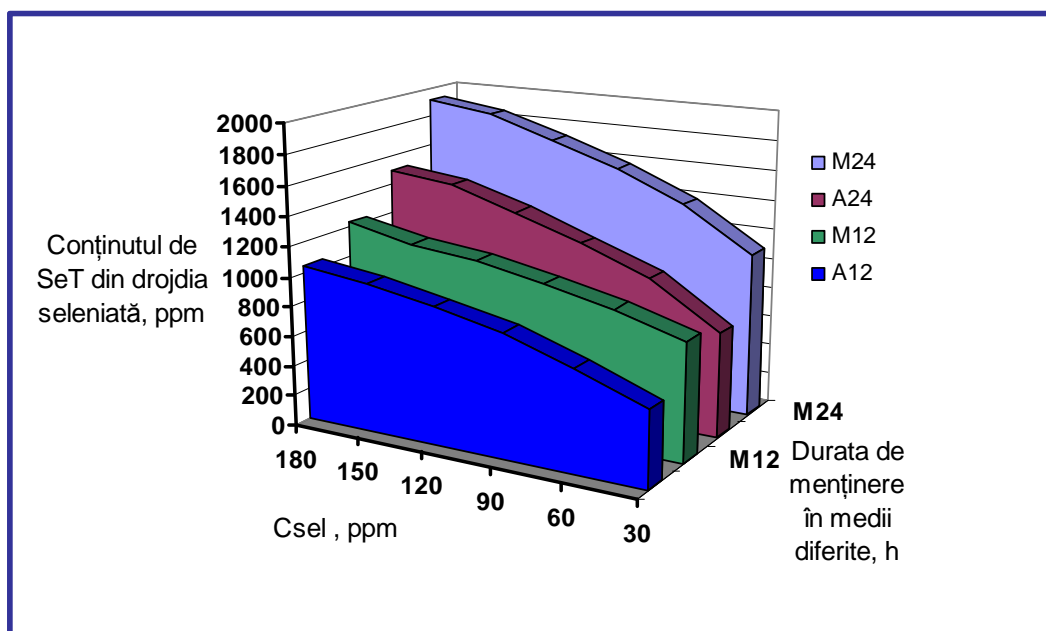


Figura 8.16. Variația conținutului total de seleniu al drojdiei seleniate după 12 h și 24 h, la 30°C, pentru două medii industriale cu 10% biomasă și concentrația 30-180 ppm  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

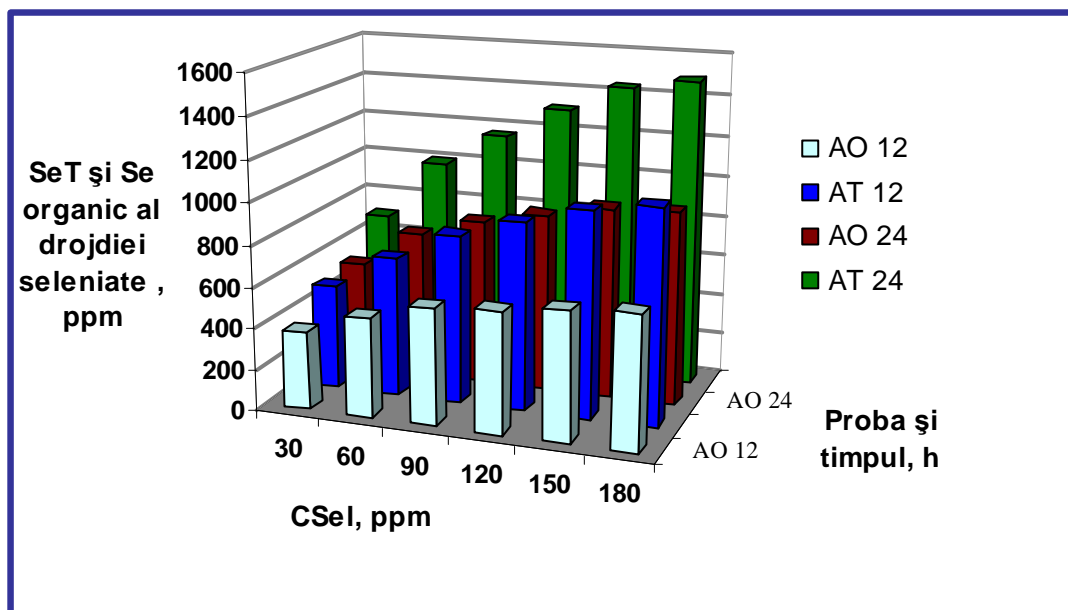


Figura 8.17. Variația conținutului total de seleniu și al seleniului organic al drojdiei seleniate după 12 h și 24 h, la 30 °C, pentru ape de spălare cu 10% biomasă și concentrația 30-180 ppm Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>

### Influența pH -ului mediului nutritiv și a concentrației de seleniu asupra procesului de seleniere

Din figura 8.19 reiese că pH-ul influențează ambele tipuri de procese de acumulare a Se : absorbtiv-de pătrundere în interiorul celulei și adsorbtiv-de depunere pe suprafața celulei.

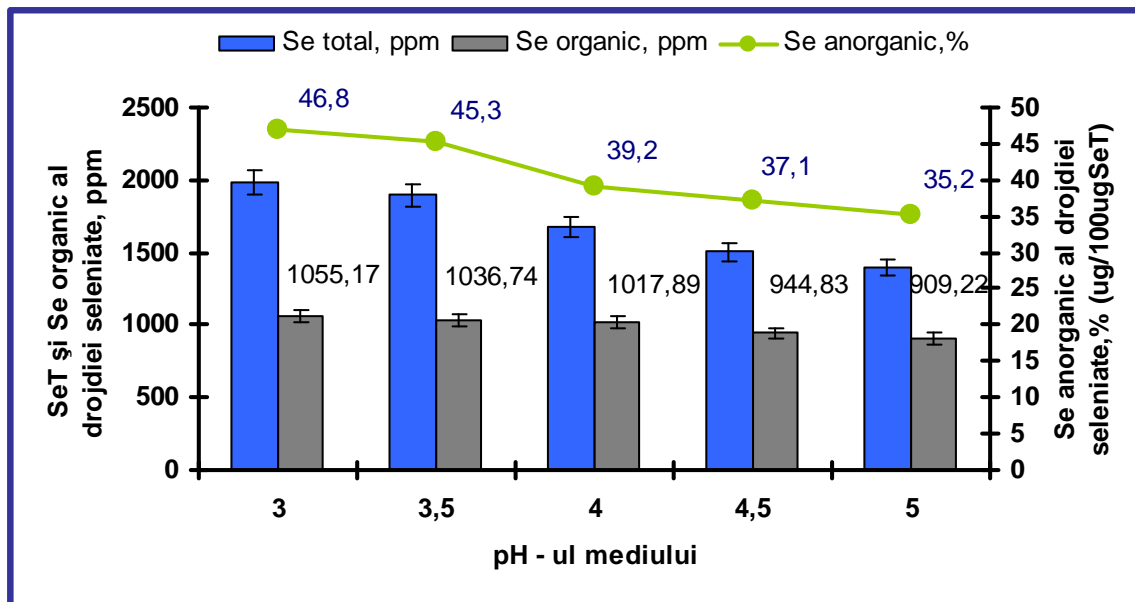


Figura 8.19. Variația conținutului total de seleniu și al seleniului organic al drojdiei seleniate la pH variabil, după 24 h, la 30 °C, pentru ape de spălare cu 10% biomasă și 120 ppm Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>

La valori scăzute de pH, sunt mai intense ambele procese, rezultând cantități maxime de Se organic și Se anorganic, la pH = 3, și cantități minime la pH=5. Prin creșterea pH-ului de la 3 la 5, conținutul de Se din drojdie a scăzut cu circa : 30% SeT, 25% Se anorganic și 14% Se organic.

### 8.3.3. Studiul capacității de multiplicare a drojdiei pe durata procesului de seleniere a drojdiei reziduale

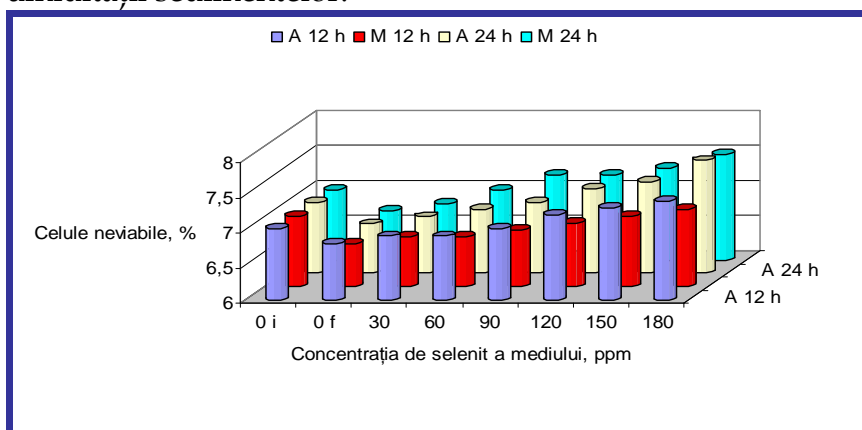
Monitorizarea procesului de multiplicare a drojdiei în timpul operației de îmbogățire cu seleniu s-a realizat pe două căi principale:

- studiul acumulării de biomasă pe durata procesului de seleniere ;
- studierea consumului de glucide reducătoare pe durata selenierii.

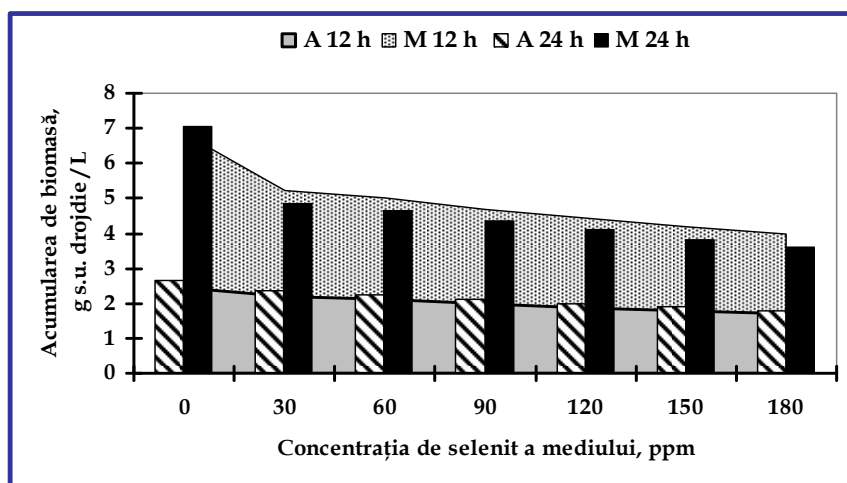
#### Studiul acumulării de biomasă pe durata cultivării drojdiei în medii cu seleniu

S-au aplicat, pentru relevanță, trei metode de analiză a acumulării de biomasă :

- A. măsurarea spectrofotometrică a densității optice, la o lungime de undă,  $\lambda = 550 \text{ nm}$ ;
- B. numărarea directă a celulelor viabile și neviabile cu ajutorul camerei Thoma ;
- C. aprecierea cantității de biomasă după centrifugarea suspensiilor și determinarea umidității sedimentelor.



**Figura 8.21.** Variația numărului de celule neviabile de drojdie, la temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , după 12 h și 24 h, pentru ape de spălare și must de malț cu 10% biomasă și concentrații diferite de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$   
0 i, 0 f – proba martor fără seleniu înaintea cultivării respectiv după cultivare



**Figura 8.23.** Variația acumulării de biomasă, la temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , după 12 h și 24 h, pentru ape de spălare și must de malț cu 2% biomasă și concentrații diferite de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

Inițial, înaintea cultivării, toate probele aveau un conținut de celule neviabile de 7%. După cultivarea în medii fără seleniu (probele martor), conținutul de celule moarte a scăzut, datorită apariției celulelor tinere, ajungând la un procent cuprins în intervalul de 6,6...6,8 % (10% biomasă) și 2,9...5,2% (2% biomasă). Este evidentă scăderea capacității de multiplicare cu creșterea procentului de biomasă.

O cantitate mai mare de extract în mediu reduce influența negativă a concentrațiilor mari de Se asupra capacității de multiplicare a drojdiilor.

În intervalul 12 - 24 h, acumularea de biomasă este mai mare decât acumularea de biomasă din primele 12 h, ceea ce corespunde comportării normale a unui microorganism care se acomodează mai întâi cu mediul de cultură.

### Studierea consumului de glucide reducătoare pe durata selenierii

Capacitatea de multiplicare a drojdiei a fost studiată și prin determinarea consumului de substrat glucidic, concretizat în conținutul de zahăr reducător exprimat în glucoză (conținut de « glucoză ») sau în maltoză (conținut de « maltoză »), remanent în mediu la finalul perioadei de cultivare a drojdiei.

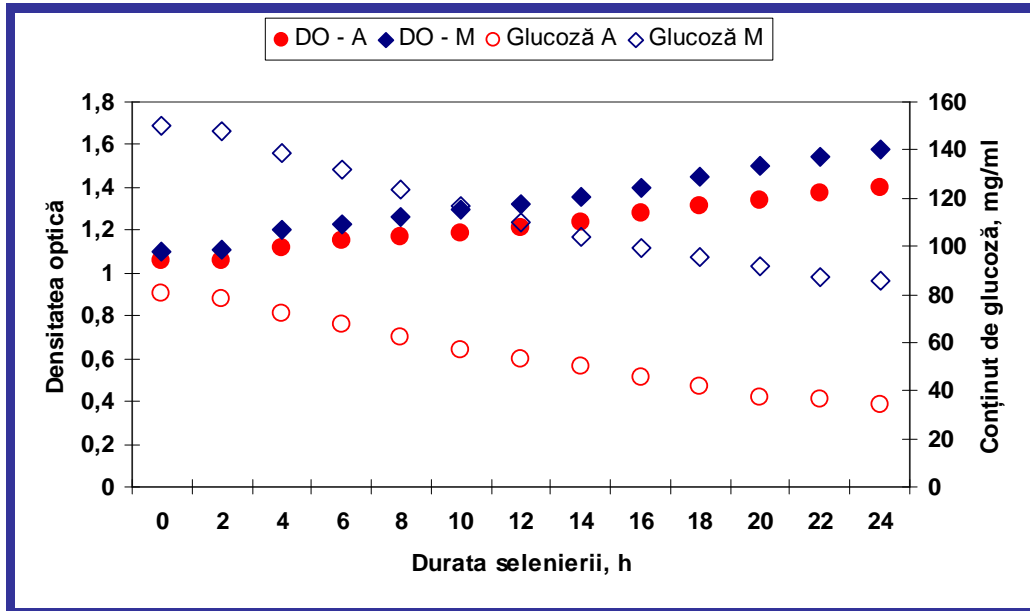


Figura 8.27. Multiplicarea celulelor de drojdie din must respectiv ape de spălare îmbogățite cu  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (30 ppm) la temperatura de  $30^\circ\text{C}$  și o concentrație în biomasă de 10 % în timp de 24 h

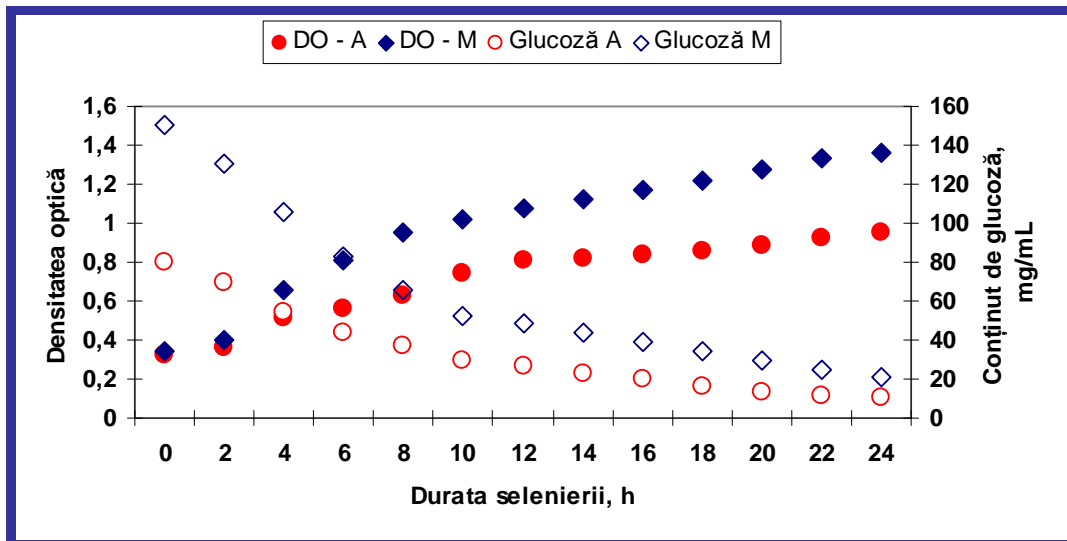


Figura 8.29. Multiplicarea celulelor de drojdie din must respectiv ape de spălare îmbogățite cu  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (30 ppm) la temperatura de  $30^\circ\text{C}$  și o concentrație în biomasă de 2 % în timp de 24 h

La finalul procesului de seleniere, s-a confirmat creșterea capacității de multiplicare a drojdiei concomitent cu scăderea procentului de biomasă inoculată, prin mărirea consumului de glucid reducător pe durata selenierii.

În 24 h de seleniere, consumul de glucid reducător exprimat în glucoză a fost aproape dublu când mediile industriale au fost cultivate cu 2% biomasă, comparativ cu 10% biomasă, deși cantitatea de biomasă inițială a fost de cinci ori mai mică.

### 8.3.4. Studiul modalității de încorporare a seleniului în celula de drojdie Influența seleniului asupra conținutului de aminoacizi liberi din drojdia seleniată

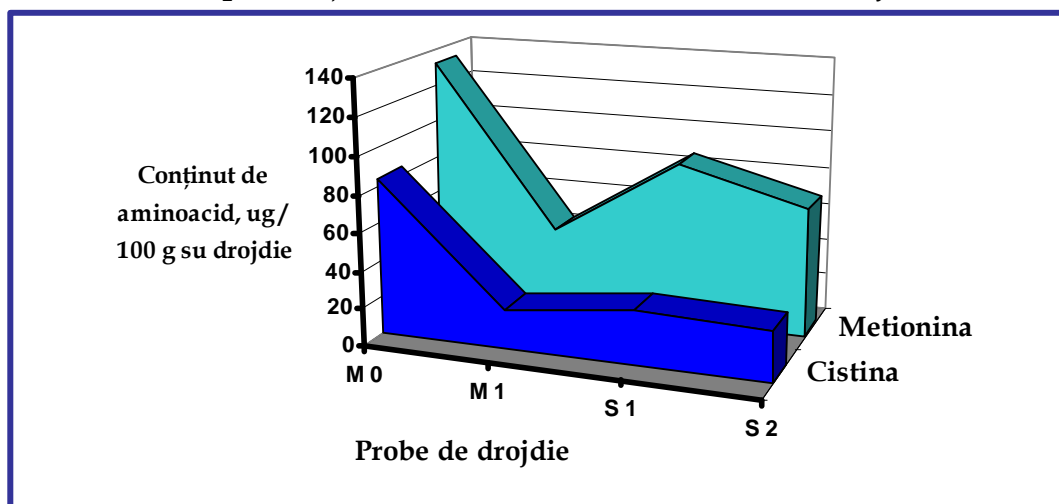


Figura 8.33. Variația conținutului de cistină și metionină la cultivarea drojdiei în ape de spălare îmbogățite cu selenit de sodiu

Tabelul 8.13. Evoluția conținutului de aminoacizi liberi din drojdia seleniată la diferite doze de selenit de sodiu în apele de spălare

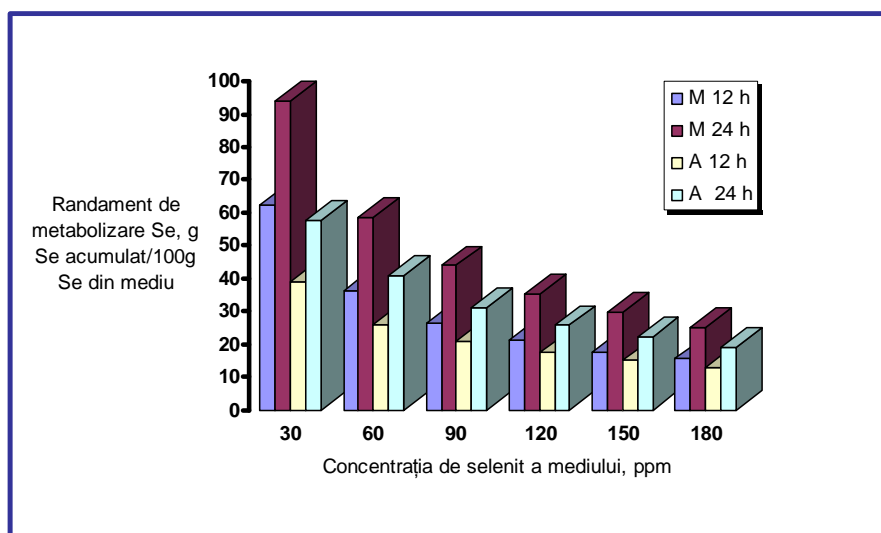
Aminoacid, μg/100g S.U. drojdie	Proba martor M 0 Drojdie necultivată	Proba martor M 1 Drojdie cultivată	Proba S 1 Drojdie seleniată pH 3 30 ppm Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Proba S 2 Drojdie seleniată pH 3 120 ppm Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>
Acid aspartic	223,9	16,4	42,4	30
Acid glutamic	171	164	326,6	322,4
Serina	231,6	26,9	57,6	50,9
Histidina	321,6	16,9	78,5	76,6
Glicina	124	7,3	30,3	30
Treonina	28,9	12,8	17	39,3
Alanina	161,8	87,6	238,8	236,6
Arginina	135,6	66,1	127,5	107,4
Tirozina	256,2	15	34,6	27,9
Valina	159,3	45	72,4	57,8
Fenilalanina	349,7	35,1	78,4	58,8
Izoleucina	329,5	32,2	64,4	48,8
Leucina	164,3	64,3	132,2	112,7
Lizina	142,3	28,5	38	30,5
Prolina	159,2	20,8	38,3	31,8

Comparând conținutul total de aminoacizi liberi al drojdiei reziduale cultivate în mediu fără selenit cu al drojdiei cultivate în ape de spălare cu 10 % biomasă, la temperatura de 30°C, timp de 24 h, la pH=3,0 - 5,0 și o concentrație în selenit de sodiu de 30 ppm și 120 ppm s-au constatat creșteri ale acestuia în mediul seleniat în raport de 1,1 - 4,6 și un raport de creștere de 1,3-2 pentru metionină și cistină.

Prin creșterea conținutului de aminoacizi cu sulf (cistina și metionina), cât și a celorlalți aminoacizi liberi din drojdia seleniată, se poate vorbi de o formă organică de legare a seleniului în celulă, prin înlocuirea atomului de sulf cu atomul de seleniu, respectiv încorporarea mineralului în alte macromolecule biologice, influențând procesele de biosinteză a proteinelor.

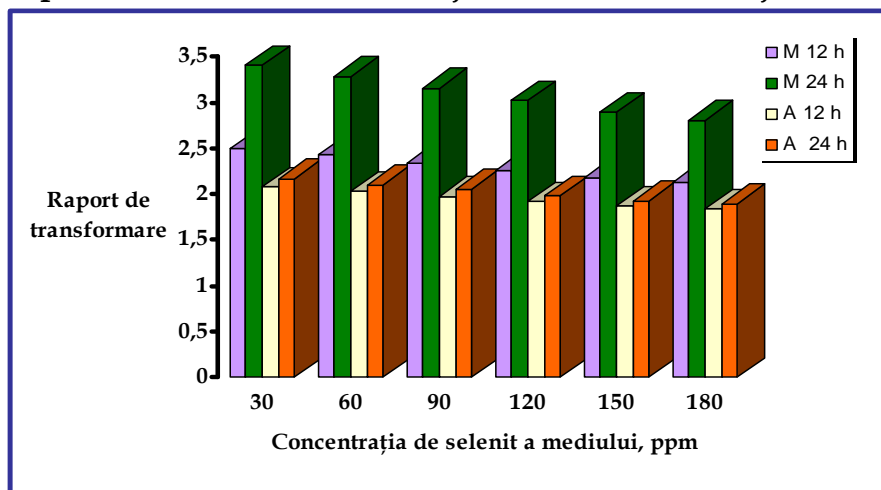
### 8.3.5. Calcularea randamentelor specifice procesului de seleniere

#### Randamentul de metabolizare a seleniului din mediul de cultură



**Figura 8.39.** Variația randamentului de metabolizare a seleniului la temperatura de 30°C pentru mediile industriale cu 10 % biomasă. Cel mai mare randament de utilizare a seleniului îl are drojdia cultivată în must de malț cu 10% biomasă, în timp de 24 h, la o concentrație minimă în selenit de 30 ppm (93,9%).

#### Raportul de transformare a drojdiei reziduale în drojdie seleniată



**Figura 8.42.** Variația raportului de transformare a drojdiei reziduale în drojdie seleniată la temperatura de 30°C pentru mediile industriale cu 2 % biomasă. Capacitatea maximă de multiplicare a drojdiei (de 3,4 ori), se dovedește a fi în mustul de malț, cu o concentrație de 30 ppm  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  și 2% biomasă, în timp de 24h.



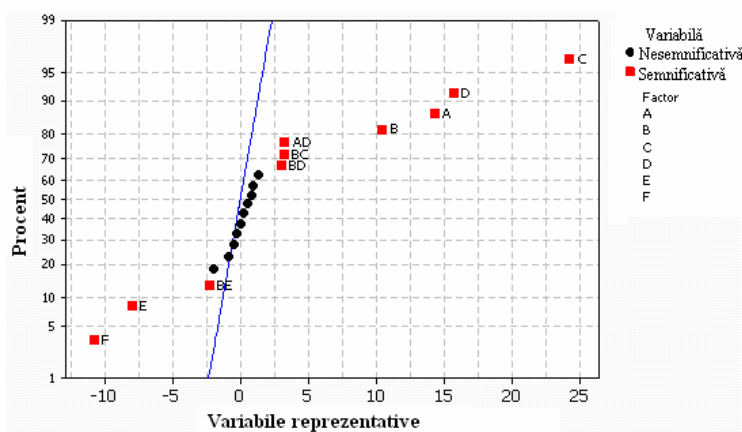
### 8.3.6. Metode statistice de evaluare - interpretare a procesului de seleniere

#### Model de optimizare de tip factorial la îmbogățirea drojdiei reziduale cu seleniu

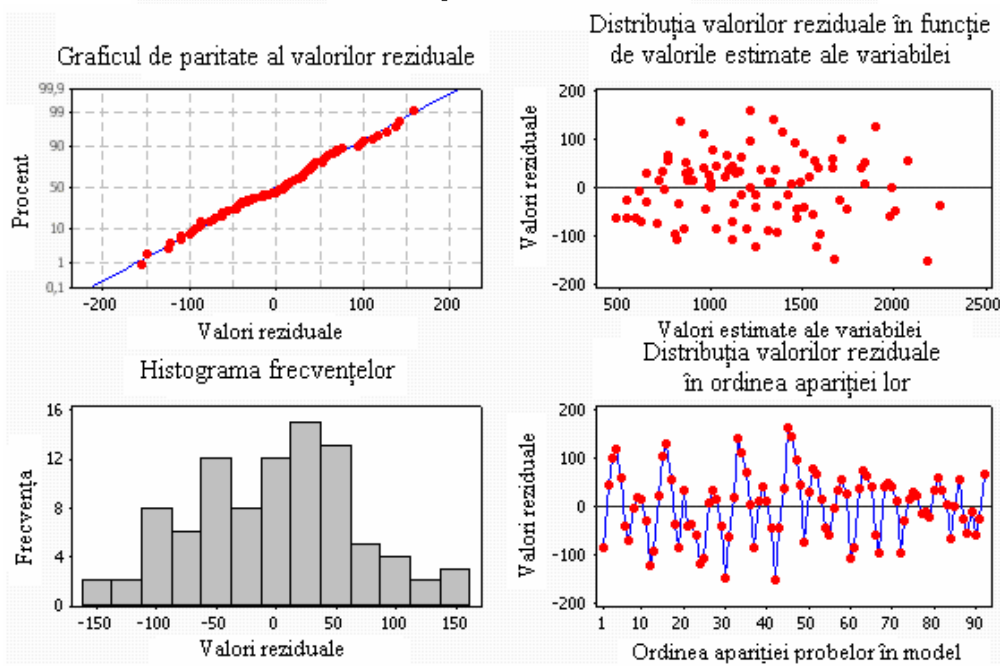
1. În prima etapă s-a aplicat un program de modelare cu șase variabile independente (șase factori), pentru a evidenția influența acestora asupra conținutului total de seleniu (SeT) din drojdia îmbogățită în minerale, indicator chimic reprezentat de variabila dependentă Y. Factori: concentrația de selenit a mediului nutritiv (CSel) - X<sub>1</sub>(A); natura mediului de cultivare - X<sub>2</sub> (B); temperatura de seleniere - X<sub>3</sub> (C); durata selenierii - X<sub>4</sub> (D); cantitatea de biomasă de drojdie supusă selenierii - X<sub>5</sub> (E); pH-ul mediului de cultură - X<sub>6</sub> (F).

Modelul matematic a fost exprimat prin următoarea ecuație polinomială:

$$Y = 1371,7 + 601,6 X_1 + 297,7 X_2 + 444,5X_3 + 463,8X_4 - 168,9X_5 - 709,6 X_6 + 54,9X_1X_2 + 13,3 X_1X_3 + 143,9 X_1X_4 + 0,6 X_1X_5 + 58,8 X_2X_3 + 88,8 X_2X_4 - 48,6X_2X_5 + 5,6 X_3X_5 - 6,2X_1X_2 X_3 + 36,7 X_1X_2 X_4 - 61,3 X_1X_2 X_5 + 30,8 X_1X_3X_5 - 9,2 X_2X_3X_5 - 25,7 X_1X_2 X_3X_5 \quad (8.7)$$



**Figura 8.43.** Efectele variabilelor reprezentative asupra conținutului total de seleniu din drojdie valabile pentru modelul 1 - cu trei medii nutritive ( $\alpha = 0,05$ )



**Figura 8.44.** Graficele valorilor reziduale pentru conținutul total de seleniu din drojdie (modelul 1) Între datele experimentale există o foarte bună corelație, găsindu-se un model care exprimă foarte bine dependența SeT din drojdie de condițiile de lucru asigurate experimental.

#### 8.4. Concluzii parțiale

1. S-a elaborat un procedeu de obținere, în condiții de laborator, a drojdiei seleniate, prin cultivarea drojdiei reziduale (G5), în medii industriale, utilizând ca sursă de seleniu selenitul de sodiu în concentrație de 30 – 180 ppm în mediu, în timp de 12 h sau 24 h, la temperaturi de 20°C sau 30°C, prin adăugarea treptată sau într-o singură doză a selenitului în mediu, cu un procent de 2%, 4%, 10% biomasă inoculată, la pH = 3 – 5,5 și prin agitare continuă la 200 rpm.

2. Studiind dinamica procesului de seleniere, s-au stabilit condițiile optime de îmbogățire cu mineral, evitând efectul toxic, inhibitor al seleniului asupra drojdiei:

- concentrația în selenit a mediului 30 ppm;
- temperatura 30°C;
- durata 24 h;
- proporția de biomasă de drojdie inoculată 2...10%.

3. Prin liofilizare, s-a obținut un biopreparat de drojdie reziduală seleniată pulbere, cu un conținut în seleniu total (determinat prin ICP-MS) de : 625 – 2215 ppm în cazul drojdiei cultivate în must de malț și 412 – 1624 ppm în cazul drojdiei cultivate în ape de spălare.

4. S-a obținut un randament maxim de metabolizare a seleniului (93,9%), la proporția maximă de biomasă inițială inoculată (10%), și un raport maxim de transformare a drojdiei reziduale în drojdie seleniată (3,4), la proporția minimă de biomasă inițială (2%), ceea ce indică o slabă multiplicare a celulelor la un conținut mare de biomasă și o multiplicare intensă a celulelor la un conținut mic de biomasă, în mediul de cultivare seleniat.

5. S-a demonstrat încorporarea seleniului sub formă organică în celula de drojdie, determinând comparativ, prin cromatografie HPLC, modificările cantitative ale conținutului de aminoacizi liberi cu sulf (cistina și metionina), în care seleniul a înlocuit sulful dar și modificările celorlalți aminoacizi liberi, datorate rolului deținut de seleniu în procesul de biosinteză a proteinelor.

6. Pornind de la constatarea că a scăzut semnificativ conținutul de aminoacizi liberi din drojdia brută, în urma cultivării biomasei în mediul nutritiv, se poate trage concluzia că drojdia reziduală devine rentabilă în procesul de seleniere și prin aportul ei la mărirea substratului azotos necesar dezvoltării celulelor, aminoacizii liberi din mediul nutritiv provenind, probabil, din procesul de autoliză a drojdiei reziduale.

7. Studiul statistic a demonstrat că rezultatele experimentale obținute în desfășurarea procesului de seleniere pot explica un model de optimizare foarte bun și toți factorii de mediu au influență semnificativă asupra îmbogățirii drojdiei cu seleniu

8. Experimentele au dovedit simplitatea schemei tehnologice de seleniere a drojdiei reziduale, în raport cu procedeele de cultivare a drojdiei în mai multe etape de preinoculare și inoculare, pentru adaptare la concentrații foarte mari de seleniu, când se obțin, probabil, și cantități mult mai mari de drojdie seleniată.

9. Ca o consecință a simplității procedurii, se deduce caracterul mai economic al acestuia : mai puțin consum de abur, energie electrică și echipamente, cantități mai mici de drojdie epuizate ce sunt deversate în mediu și costuri mai mici pentru realizarea mediului de cultură comparativ cu selenierea în mai multe etape.

## 10. Concluzii generale

- S-a stabilit un procedeu de valorificare complexă a drojdiei reziduale care a condus la obținerea a două produse principale: beta-glucan pulbere respectiv biopreparat de drojdie seleniată și două produse secundare : extract de drojdie cu însușiri de aromatizare și reziduu celular ca supliment furajer.

- Prin aplicarea a două metode laborioase de tratare chimică și termică a biomasei și prin studierea comparativă a două generații de drojdie reziduală G4 și G6 s-au obținut produse  $\beta$ - Glucan pulbere de uz farmaceutic, de puritate avansată, cu valori apropiate între generații :

- puritate: 93,42 – 95,88% s.u. drojdie G 4 și 93,15 – 95,17% s.u. drojdie G 6;
- randament de obținere: cca. 13 – 16% (g  $\beta$ -glucan/100g s.u. drojdie).

- Pentru a înlesni extragerea  $\beta$ -glucanului, s-a adoptat soluția fragmentării celulei de drojdie și s-au studiat comparativ opt metode de rupere a peretelui celular (plasmoliza, termoliza, mojararea, congelarea-decongelarea, tratamentul alcalin, ultrasonarea, mărunțirea cu bile și autoliza ), dintre care cele mai bune rezultate au dat autoliza urmată de mărunțirea cu bile.

- S-a efectuat un studiu aprofundat al mărunțirii la moara cu bile și s-au stabilit condițiile optime de lucru: durata 20 min., frecvența 30 Hz, număr de bile 5 și diametrul bilei 12 mm.

- S-a pus la punct un procedeu simplificat de obținere a  $\beta$ -glucanului din drojdie, demonstrând că se poate izola  $\beta$ -glucan din drojdie reziduală, prin tratarea alcalină, într-un singur pas, a peretelui celular (condiții optime: concentrația NaOH 1N, durata 1h, temperatura 90°C, raportul perete celular: NaOH 1:5), rezultatul fiind un produs beta-glucanic pastă de uz alimentar, de puritate mai mică, având drept compuși de contaminare glicogenul și proteinele:

- puritate: 55,5% s.u. drojdie - după autoliză, timp de 48h, la temperatura de 50°C ; 50,1% s.u. drojdie - după autoliză, timp de 24h, la temperatura de 50°C; 47,2% s.u. drojdie - după mărunțire cu bile;
- randament de obținere: cca. 7% (g  $\beta$ -glucan/100g s.u. drojdie).

- Au fost studiate, în paralel, patru metode de determinare a  $\beta$ -glucanului din Drojdie, cu rezultate comparabile, valorile cele mai mari înregistrându-se la determinarea cu ajutorul kit-ului KYBGL, urmată de determinarea glucozei prin HPLC.

- S-a demonstrat prin studiu senzorial, fizico-chimic, microbiologic și reologic, că  $\beta$ -glucanul pastă din drojdia reziduală poate fi folosit ca înlocuitor de material gras, în diferite proporții (25, 50, 75%), la prepararea maionezei, obținând produse alimentare și de catering cu un aport redus de calorii, cel mai stabil produs fiind maioneza cu 50%  $\beta$ glucan: 77 zile la cald (375 cfu/g) și 119 zile la rece (405 cfu/g) ; studiul reologic a arătat că maionezele cu  $\beta$ -glucan sunt bine structurate, cu o rețea consolidată, se pot caracteriza drept geluri cu remarcabila abilitate de a se comporta în anumite situații ca un solid, păstrând, în același timp, mai multe proprietăți ale componentelor fluidului și au proprietăți de emulsionare și de îngroșare.

- În urma separării peretelui celular din biomasa de drojdie supusă autolizei, s-a utilizat supernatantul obținut, după adăugare de zahăr și tratament termic, ca extract de drojdie cu însușiri de aromatizare (aromă de ciuperci), produs concentrat sau liofilizat,

cu un conținut de 68-70% s.u. proteine și un conținut scăzut de 3,2-3,5% ARN, recomandat ca adaos la produse cu gust nedefinit.

- Având ca finalitate valorificarea completă și eficientă a drojdiei reziduale, fără a deversa componente utile la rețeaua de canalizare, s-a analizat supernatantul rezultat după tratarea alcalină a peretelui celular, și s-a considerat că, după neutralizare și concentrare sau liofilizare, acesta poate fi folosit ca adaos în hrana animalelor, având un conținut de 59-63% s.u. proteine.

- S-a realizat un procedeu de obținere, în condiții de laborator, a drojdiei seleniate, dovedind că se poate obține drojdie îmbogățită cu seleniu și din drojdie de bere reziduală, fără asigurarea unei aerări suplimentare controlate și fără adaptarea drojdiei la concentrații mărite de selenit în mediu, folosind pentru cultivarea celulelor mediul de cultură Wickerham și două medii nutritive industriale -mustul de malț și apele de spălare a borhotului. Conținutul total de seleniu al drojdiei a ajuns la 625 - 2215 ppm în cazul mustului de malț și 412-1624 ppm în cazul apelor de spălare (conținut de seleniu anorganic 5,3-38,5%). S-a realizat un randament de metabolizare a seleniului de max. 93,9% pentru 10% procent de biomasă inoculată și un raport maxim de transformare a substratului în drojdie seleniată de 3,4 pentru un procent de 2% biomasă inoculată.

- S-a studiat dinamica procesului de seleniere, stabilind o serie de factori care influențează apreciabil acumularea mineralului, modificând următoarele condiții de lucru: concentrația de selenit a mediului 30 - 180 ppm, temperatura 20°C sau 30°C, durata 12 h sau 24 h, proporția de biomasă 2%, 4% sau 10%, tipul de mediu nutritiv, pH-ul= 3 - 5,5 și modul de adăugare a selenitului în mediu. S-au stabilit condițiile optime de îmbogățire cu mineral, astfel încât să fie evitat efectul toxic, inhibitor al seleniului asupra drojdiei, concretizate în special, în concentrația minimă de selenit de sodiu în mediul de cultivare a drojdiei.

- S-a studiat influența seleniului asupra capacității de multiplicare a drojdiei reziduale, în mediul seleniat, prin mai multe metode de apreciere a creșterii biomasei cultivate ajungând la concluzia că este încetinită multiplicarea la concentrații mari de seleniu sau proporții mari de drojdie inoculată.

- S-a demonstrat modalitatea de încorporare a seleniului în celula de drojdie, determinând modificările cantitative ale conținutului de aminoacizi liberi, în special cei cu sulf - metionina și cistina, care pot confirma ipoteza înlocuirii atomului de sulf cu seleniu în molecula aminoacizilor cu sulf dar și rolul acestui mineral în procesul de biosinteză a proteinelor.

- Din punct de vedere tehnico-economic, în urma experimentelor, se pot contura trei variante de lucru, în aceleași condiții de temperatură, durată, natura mediului și conținut minim de seleniu al mediului:

- inoculând o cantitate de 2% drojdie reziduală se poate obține o cantitate triplă de drojdie seleniată dar folosind mai puțin eficient sursa de seleniu (63,7%);
- inoculând o cantitate de 5 ori mai mare de drojdie reziduală cantitatea de drojdie seleniată se mărește foarte puțin dar este utilizată eficient sursa de seleniu (93,9%);
- inoculând o cantitate mică de drojdie reziduală iar după separarea biomasei de drojdie seleniată din mediu să se recupereze seleniul, prin reutilizarea mediului seleniat remanent, într-un nou ciclu de seleniere.

## 12. Diseminarea rezultatelor cercetărilor

Rezultatele cercetărilor s-au materializat prin publicarea a **7 lucrări științifice**, dintre care **1 articol cotate ISI** și **5 articole** în reviste indexate în baze de date internaționale, din care 1 articol prezentat și ca lucrare în cadrul unui simpozion internațional, secțiunea Poster :

### A. Articole cotate ISI

1. **Gina Marinescu**, Antoneta Stoicescu, Livia Pătrașcu, 2011, The preparation of mayonnaise containing spent brewer's yeast  $\beta$ -glucan as a fat replacer. *Romanian Biotechnological Letters*, 16 (2), 6017-6025

### B. Articole indexate în baze de date internaționale

2. **Gina Marinescu**, Antoneta Gabriela Stoicescu, Liliana Teodorof, 2011, Industrial nutrient medium use for yeast selenium preparation . *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI FOOD TECHNOLOGY*, 35 (1), 45-53, ISSN 1843 - 5157
3. **Gina Marinescu**, Antoneta Stoicescu, Liliana Teodorof, 2010, Selenium yeast from spent brewer's yeast. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 16(3), 341-345
4. **Gina Marinescu**, Antoneta Stoicescu, Andrei Bolocan, 2010, Comparative study of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans determination methods . *Scientific Bulletin Biotechnology* , U.S.A.M.V. Bucharest, Serie F, vol. XIV, 23 -30, ISSN 1224 -7774
5. **Gina Marinescu**, Antoneta Stoicescu, 2009, Researches concerning the preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans . *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 15 (4), 547-553
6. **Gina Marinescu**, Antoneta Stoicescu, 2009, Eight cell disruption methods for the obtaining of spent brewer's yeast cell wall. *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium „New Researches in Biotechnology”* USAMV Bucharest, Series F , Special Volume, *Scientific Bulletin Biotechnology* , 228 - 235, ISSN 1224 - 7774

### C. Articole publicate în volumele unor manifestări științifice naționale cu participare internațională

7. **Gina Marinescu**, 2008, Spent brewery yeast revaluation – a real benefit for nutrition, health and environment . *Lucrările Conferinței cu Participare Internațională din cadrul proiectului CEEEX/3/160/2006, „Politici și strategii de dezvoltare regională”*, Universitatea Dunarea de Jos din Galați, 220-227, ISBN 978-606-8008-54-7

## Referințe bibliografice

- Abraham J., Bhat S.G. (2008) – Permeabilization of baker's yeast with N-lauroyl sarcosine, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(8), p.799-804
- Anghel I., Herlea V., Vassu T., Dan V., Segal B., Oancea I., Berzescu P., Kathrein I. (1991)- *Biologia și tehnologia drojdiilor*, vol. II, *Editura Tehnică*, București
- Anton M., Chapleau N., Beaumal V., Delepine S., Anton M.L. (2001) – Effect of high-pressure treatment on rheology of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2, p. 9-21
- Bahl A.K., Vercellotti S.V., Vercellotti J.R., Klein E. (2009) – Methods of Purifying Beta Glucans, *US Patent nr.7550584*
- Bahrim G. (2004) - *Biotehnologii industriale*, *Editura Academica Galați*
- Bărbulescu I.D., Popa O., Niță S., Băbeanu N., Ene E. (2008) - Procedeu de obținere a unui bioprodus pe bază de seleniu și crom, *Brevet de Invenție (Cerere A00353/13.05.08)*, *INCDCF-București*
- Campbell B. (2002) - Cell Disruption: Breaking the Mould: An Overview of Yeast and Bacteria High-Pressure Cell Disruption, *International Labmate Sue Fakes ILM Features Editor*, p:16-17
- Cao W., Li X.Q., Liu L., Yang T.H., Li C., Fan H.T., Lia M., Lu Z.G., Mei Q.B. (2006) - Structure of an anti-tumor polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels, *Carbohydrate Polymers*, 66(2),149-159
- Capron I., Costeux S., Djabourov M. (2001) – Water in water emulsions: phase separation and rheology of biopolymer solutions, *Rheological Acta*, 40, p. 441-456
- Câmpeanu G., Dumitru I. F. (2002) - *Progrese în biotehnologie*, *Universitatea din București*
- Dallies N., Francois J., Paquet V. (1998) - A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 14(14): 1297-306
- Dan V. (2001) - *Microbiologia alimentelor*, *Editura Alma*, Galați
- Dickinson E. (2003) – Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems, *Food Hydrocolloids*, 17, p. 25-39
- Encinar J.R., Ouerdane L., Buchmann W., Tortajada J., Lobinski R., Szpunar J. (2003) - Identification of Water-Soluble Selenium-Containing Proteins in Selenized Yeast by Size-Exclusion-Reversed-Phase HPLC/ICPMS Followed by MALDI-TOF and Electrospray Q-TOF Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 75 (15): 3765-3774

Georgescu L., Stoicescu A., Vasu S.S., Banu C., Arghir C.V. (1989) - Obținerea de derivate proteice și potențiatori de arome ( nucleotide ) prin valorificarea superioară a drojdiei de bere și spirt - *Contract de cercetare științifică și dezvoltare tehnologică, nr. 6060* Universitatea din Galați și Institutul de Chimie Alimentară București

Goldammer T. (2008) - *The Brewer's Handbook-The Complete Book to Brewing Beer*, Second Edition, Apex Publisher, Clifton Virginia

Hsia H. S., Yang P., Arnold M. (2003) - Dietary supplementation with, and methods for preparation of yeast- derived selenium salts, *US Patent 6576233*

Hubbard M. (2003) - *Statistical Quality Control for the Food Industry* , Third Edition, Kluwer Academic, Plenum Publisher, New York

Ioniță A., Bărbulescu I.D., Rughiniș D., Albulescu M., Răitaru G. (2008) - Procedeu de obținere a unui biopreparat de drojdie seleniată din culturi de *Saccharomyces cerevisiae* , *Brevet de Invenție RO 122013 B1, INCDCF-București*

Ipolyi I., Stefanka Z., Fodor P. (2001) - Speciation of Se(IV) and the selenoamino acids by high-performance liquid chromatography- direct hydrid generation- atomic fluorescence spectrometry, *Analytica Chimica Acta*

Jamas S., Rha C., Sinskey A.J. (1996) - Process for preparing glucanase resistant yeast mutants, *US Patent nr. 5506124*

Kath F., Kulicke W.M. (1999) - Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 268(1): 59-68

Kim Y.H., Kang S.W., Lee J.H., Chang H.I., Yun C.W., Paik H.D., Chang C.W., Kim S.W. (2007) - High Cell Density Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 in Fed-batch Culture for the Production of  $\beta$ -Glucan, *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 13(1): 153-158

Laroche C., Michaud P. (2007) - New Developments and Prospectives Application for  $\beta$ -1,3 Glucans, *Recent Patents on Biotechnology*, 1(1), p.59-73

Lazaridou A., Biliadris C.G., Izydorczyk M.S. (2003) - Molecular size effects on rheological properties of oat  $\beta$ -glucans in solution and gels, *Food Hydrocolloids*, 17, p. 693-712

Liang L., Mo S., Zhang P., Cai Y., Mou S., Jiang G., Wen M. (2006) - Selenium speciation by high-performance anion-exchange chromatography-post-column UV irradiation coupled with atomic fluorescence spectrometry, *Journal of Chromatography A* , 1118 (1): 139-143

Lipke P.N., Ovalle R. (1998) - Cell wall Architecture in yeast: New structure and New Challenges, *Journal of Bacteriology*, 180(15), p. 3735-3740

Ma L., Barbosa-Canovas G.V. (1995) - Rheological characterization of mayonnaise. Part II: Flow and viscoelastic properties at different oil and xanthan gum concentrations, *Journal of Food Engineering*, 25, p. 409-425

Moesgaard S., Paulin H.S. (2003) – A selenium yeast product, a method of preparing a selenium yeast product and the use of the product for preparing food, a dietary supplement or a drug, *Patent WO 078605*, Danemarca

Nagodawithana T., Gutmanis F. (1985) - Method for the production of selenium yeast *US Patent 4530846*

Opawale F.O., Burgess D.J. (1998) – Influence of Interfacial Properties of Lipophilic Surfactants on Water-in-Oil Emulsion Stability, *Journal of Colloid and Interface Science*, 197, p.142-150

Passwater R.A. (2011) – New Discoveries Expand Our Knowledge About Selenium' s Importance, *Interviews with Nutritional Experts*, [www.healthy.net](http://www.healthy.net)

Rotaru G., Borda D. (2002) – Controlul Statistic în Industria Alimentară, vol.I, Editura Academica Galați

Schrauzer G.N. (2006) - Selenium yeast: Composition, quality, analysis and safety, *Pure Appl. Chem.*, 78 (1): 105-106

Stoicescu A.G. (1984) – Cercetări privind formarea alcoolilor superiori în principalele procese fermentative, *Teză de doctorat, Universitatea din Galați*

Suhajda A., Hegoczki J., Janzso B., Pais I., Vereczkey G. (2000) - Preparation of selenium yeasts.I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 14(1): 43-47

Supphantharika M., Khunrae P., Thanardkit P., Verduyn C. (2003) - Preparation of spent brewers yeast  $\beta$ -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, *Bioresource Technology*, 88 (1): 55-60

Teodorof L., Năstase C., Anuți I., Stroe M. (2009) - Heavy metals extraction and analysis in aquatic ecosystems with automated techniques, *Advancas in Electrical and Computer Engineering, Suceava, România*, 9(2), p.99-102

Thammakiti S., Supphantharika M., Phaesuwan T., Verduyn C. (2004) - Preparation of spent brewers yeast (beta)- glucans for potential applications in the food industry, *International Journal of Food Science and Technology*, 39 (1), p. 21-29

Thanardkit P., Khunrae P., Supphantharika M., Verduyn C. (2002) - Glucan from spent brewers yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feeds, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(6): 527-539

Varga E. (2004) - Compoziție și procedeu de obținere a comprimatelor de drojdie îmbogățite cu seleniu, *Brevet de invenție RO 118840 B, România*

Zlatkovic D., Jakovljevic D., Zekovic D., Vrvic M.M. (2003) –A glucan from active dry baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): A chemical and enzymatic investigation of the structure, *Journal Serbian Chemical Society*, 68(11), p. 805-809



