

Stadiul si rezultatele obtinute in Etapa I/2017

1. Validarea prin analize fizico-chimice a substratului de dezvoltare pentru drojdiile carotenogene

Substraturile selectate ca medii de dezvoltare si de sinteza a metabolitilor de catre drojdiile carotenogene sunt subproduse agro-alimentare acceptate ca furaj: tarate de orez, tarate de grau si malt de grau.

Determinarea concentratiei microelementelor **Mg, Ca, K, Na, Mn, Fe, Zn, Cu, Ni, Cr, Pb** s-a efectuat prin metoda ICP-OES (Spectrometrie de Emisie Optica cu Plasma Cuplata Inductiv), din cenusa. Dupa parcurgerea mai multor etape (pregatirea probei, etalonarea echipamentului ICP-OES, liniaritate) s-a determinat continutul de macroelemente (Mg, Ca, K, Na, Fe) si microelemente (Mn, Zn, Cu, Cr).

Rezultatele inregistrate arata o cantitate de zinc cuprinsa intre 24,6 mg/kg (malt de grau) si 80,6 mg/kg (tarate de grau). Crescand cantitatea de tarate de grau in dieta pasarilor, balanta zincului ramane negativa, deoarece absorbtia lui este foarte mica, din cauza acizilor fitici, care sunt chelatati cu elemente ca Zn, Ca, Fe, Mg formand fitati, care micsoreaza absorbtia acestora.

Pentru imbunatatirea balantei zincului se propun nutreturi combinate, care contin drojdii carotenogene cultivate pe subproduse agro-alimentare acceptate ca furaj, suplimentate cu diferiti compusi ai zincului, care se vor regasi in biomasa, asigurand o absorbtie mai buna a acestuia.

2. Obtinerea biomasei de drojdii carotenogene suplimentata cu zinc

Tulpina *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033 a fost adaptata prin trecerea de pe mediul YPD (extract de drojdii, peptona, dextroza) pe mediul cu malt (extract de malt, glucoza, extract de drojdii) si apoi pe mediul de zinc.

Sursa optima de zinc din mediul de cultura cu malt, la care drojdia s-a adaptat, este Zinc Oxide Feed Grade, solubil in apa, in concentratii de 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1% si 1,25%. Concentratia de 1% zinc a generat, dupa 8 saptamani, $7,5 \times 10^6$ colonii/mL mediu.

Mediul de baza, industrial obtinut din malt, srot de soia, melasa si apa, in diferite proportii, amestecat cu apa si Zn 1% se inoculeaza cu inocul de 30×10^3 col/mL din

cultura obtinuta pe mediu cu extract de malt si Zn 1%. Adaptarea la mediul industrial, prin repicari successive, a durat 10 saptamani, numarul coloniilor fiind de 9×10^9 col/g.

Prin ridicarea la scara a mediului de baza s-au obtinut 10 kg mediu solid industrial imbogatit cu 1% Zn pe care a fost dezvoltata drojdie carotenogena.

Pentru utilizare in hrana gainilor ouatoare produsul a fost utilizat in proportie de 5% incorporat in nutret.

3. Validarea prin analize a incarcaturii microbiologice a materiilor prime furajere ce vor fi utilizate in experimente la nivel de microtest

Produsele analizate din punct de vedere microbiologic sunt maltul, srotul de soia si melasa, ingrediente din compozitia mediului solid pentru produsul cu *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033 necesar microtestului. Indicatorii microbiologici urmariti sunt reglementati prin normele publicate in Monitorul Oficial 362 bis/31 martie 2003, si anume: gradul de cotaaminare cu germeni aerobi mezofili (numar total de germeni - NTG), bacterii coliforme, *Escherichia coli*, *Salmonella*, fungi (numar total de fungi - NTF), fungi producatori de micotoxine.

Examenul bacteriologic si micologic al ingredientelor a relevat absenta bacteriei *Salmonella* si o incarcatura microbiologica redusa, care se incadreaza in limitele maxime admise stabilite prin legislatia in vigoare, si care nu influenteaza dezvoltarea drojdiei.

4. Analiza fizico-chimica si microbiologica a biomasei de drojdii carotenogene si uscarea ei

Biomasa de *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033 s-a analizat pentru determinarea proteinelor totale, a continutului de apa si solide totale, a substantelor minerale si a pigmentilor carotenoidici. Valorile inregistrate in urma aplicarii metodelor de analiza corespunzatoare sunt: proteine totale 39,1 %(w/w), solide totale 93,3 %(w/w), cenusa 8,31 %(w/w), Zn 76,7 mg/kg, β -caroten 102,1 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$.

Caracteristicile de baza ale biomasei de drojdie *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033 (substanta uscata) sunt continut mare de proteine, continut mare de β -caroten, continut mic de zinc.

S-au efectuat analize microbiologice ale biomasei levuriene, conform metodelor standard, iar rezultatele se incadreaza in limitele maxime admise stabilite prin legislatia sanitara si sanitar-veterinara in vigoare.

Uscarea biomasei de drojdii carotenogene recoltata s-a facut in etuva, la temperatura de 40⁰C, pana la greutate constanta.

5. Realizarea noilor retete de nutreturi combinate pentru gaini ouatoare cu adaosul biomasei de drojdii carotenogene suplimentate cu zinc. Fabricarea nutreturilor combinate. Organizarea unui mocoexperiment in conditii de laborator

S-au realizat noi retete de nutreturi combinate, cu adaos de biomasa de drojdii carotenogene suplimentate cu zinc, respectand mai multe etape: selectarea si caracterizarea materiilor prime furajere si a biomasei de drojdii; stabilirea structurii de baza a loturilor experimentale asigurand cerintele de energie si substante nutritive; diferentierea retetelor loturilor prin adaugarea biomasei de drojdii carotenogene suplimentate cu zinc si a premixului proteino-vitamino-mineral cu un continut diferit de zinc anorganic.

Retetele furajere pentru nutreturile combinate contin porumb, grau, srot de soia, srot de floarea soarelui, biomasa de drojdii carotenogene suplimentata cu Zn, ulei vegetal, fosfat monocalcic, metionina lizina, colina, Premix A6 cu continut de Zn cuprins intre 20 mg si 40 mg.

S-au recoltat probe pentru evaluarea calitatii nutritionale a nutreturilor combinate in vederea stabilirii continutului in principalii nutrienti: substanta uscata, proteina, grasime, celuloza, cenusa si zinc.

S-a organizat microtestul prin pregatirea halelor experimentale, achizitionarea de gaini ouatoare hibridul Lohmann Brown in varsta de 20 de saptamani si lotizarea lor, si s-a desfasurat experimentul urmarind consumul mediu zilnic, productia de oua, greutatea medie/ou, conversia furajului in ou, starea de sanatate a gainilor.

S-au recoltat oua la inceputul, la fiecare 2 saptamani, si la sfarsitul experimentului pentru determinarea parametrilor de calitate fizici (greutate ou intreg, greutate albus, greutate galbenus, greutate coaja, grosime coaja, rezistenta la spargere, pH albus, pH galbenus, intensitatea culorii galbenusului, unitatea Haugh si gradul de prospetime) si nutritionali (substanta uscata la 65⁰C si 103⁰C, proteina, grasime, cenusa si zinc).

La sfarsitul experimentului se vor efectua sacrificari, in conformitate cu legislatia din Romania, in vederea determinarii continutului de zinc in ser sangvin si ficat.

6. Controlul sanitar veterinar al oualor recoltate in perioada efectuării microtestului

Ouale recoltate s-au examinat la exterior prin verificarea formei (eliptica, cu un pol bont si unul ascutit), integritatii, marimii, aspectului si culorii cojii. Coaja trebuie sa fie curata, fara crapaturi sau fisuri, mata, nepatata si aspra.

Ouale proaspete recoltate sunt lipsite de microorganismele, care daca ar patrunde in interiorul oului ar produce modificari fizico-chimice sub actiunea enzimelor din galbenus si albus. Conform buletinului de analiza, ouale recoltate au fost testate pentru *Salmonella sp.* rezultatul fiind negativ si pentru coaja si pentru continut.

7. Diseminarea rezultatelor

A fost actualizata pagina web. Diseminarea s-a realizat prin prezentarea de comunicari stiintifice, orale si sub forma de postere, in cadrul simpozioanelor nationale si internationale si participarea la targul international „The 18th Annual Meeting Trade Fairs” in Dusseldorf, Germania, ocazie cu care s-a distribuit material de promovare a proiectului sub forma de flyere.