

## Stadiul si rezultatele obtinute in Etapa 2/2018

### 1. Ridicarea la scara a componentei tehnologiei de obtinere a nutreturilor combinate (biomasa de drojdii carotenogene suplimentata cu oligoelemente) si analiza comparativa a diferentelor intre conditiile de laborator

In scopul echilibrării regimului de furajare se utilizează aditivi furajeri de origine vegetală (coloranți), minerală (oligoelemente), de sinteză sau de fermentație, care, introduși în rețetele de nutrețuri combinate, le optimizează, adaptându-le nevoilor nutriționale ale gainilor ouătoare în diferite faze de creștere și stadii de producție.

În hrana animalelor zincul se administrează în două forme, anorganică (sulfat de zinc, oxid de zinc) și organică (aminoacizi chelați, proteinați), forma organică fiind mai bine absorbită decât cea anorganică. Drojdiile, inclusiv drojdiile roșii, au capacitatea de a prelua zincul din mediul de cultură, furnizând o formă organică a acestui microelement.

Obținerea de biomasa de *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033 suplimentată cu zinc și carotenoide dezvoltată în mediu lichid presupune parcurgerea mai multor etape: reactivarea inocului de drojdie *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033 pe mediu ATCC 200 solid în condiții aseptice, incubare statică la 30<sup>0</sup>C, la întuneric, în condiții de aerobioză, în două pasaje succesive pentru 48 ore și respectiv 24 ore; inocularea mediului ATCC 200 lichid cu inocul din cel de al doilea pasaj și obținerea inoculului starter (1,3x10<sup>7</sup> celule/mL); prepararea mediilor bazale adaptative cu malt și fără malt continuând cantități mici de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O și obținerea de biomasa de drojdie carotenogenă adaptată la acumularea ionilor de zinc; obținerea biopreparatului biomasa de drojdie îmbogățită în zinc și carotenoide prin cultivarea drojdiei în sistem submers, discontinuu (în sarje), în mediu bazal la care se adaugă ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (dizolvat separat în apă distilată și autoclavată), în concentrații de 0,025%, 0,035% și respectiv 0,050%. Parametri de lucru sunt: rata de agitare 150 rpm, temperatura 30<sup>0</sup>C, durata de cultivare 120 ore.

Rata de creștere a drojdiei în prezența diferitelor concentrații de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O în mediul de cultură se monitorizează prin măsurarea zilnică a densității optice la 600 nm, pentru a evidenția influența ionilor de zinc asupra creșterii și a performanțelor fermentației. Pe măsura ce concentrația ionilor de zinc crește de la 0,035% la 0,050%,

cultura inregistreaza, de-a lungul perioadei de cultivare, o scadere a ratei de crestere pana la inhibare severa.

Prelucrarea mediului de fermentatie consta in separarea celulelor de drojdie din mediu prin centrifugare la 5000 rpm, timp de 15 minute si spalari succesive cu apa distilata, obtinandu-se in final o crema de drojdie imbogatita in zinc si carotenoide. Uscarea drojdiei s-a realizat in etuva, la temperatura de 60<sup>0</sup>C, pana s-a ajuns la greutate constanta.

Crema de drojdii obtinuta a fost analizata, dupa uscare, pentru determinarea cantitatii de biomasa si de zinc acumulat. In mediul de cultura suplimentat cu 0,025% ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, cantitatea de biomasa recuperata a fost de 1,89g/L, iar cantitatea de zinc intracelular a fost cea mai mare de 6,12 mg/g biomasa uscata, fara a se inregistra reducerea ratei de crestere sau a viabilitatii. Eficienta acumularii zincului in biomasa a fost de 87% din totalul cantitatii de zinc din mediu. Ca raspuns la cresterea concentratiei de sulfat de zinc heptahidrat la 0,035% si 0,050%, preluarea zincului in celulele drojdiei scade la 3,173 mg/g si respectiv 0,120 mg/g.

Influenta concentratiilor de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O asupra productiei de β-caroten a fost evidentiata prin cuantificarea acestuia observandu-ae variatia cantitatii de la 2,4 mg/L la martor, la 7,1 mg/L in proba recoltata din mediul continand 0.025% ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Analiza rezultatelor obtinute evidenziaza efectul stimulator al cationilor de zinc asupra productiei volumetrica de carotenoide in biomasa de *Rhodotorula glutinis*, prin accelerarea enzimelor (in special desaturaze) implicate in biosinteza carotenoidelor, iar cea mai mare cantitate de β-caroten s-a obtinut la cea mai mica concentratie de zinc. Concentratiile mari de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O inhiba pigmentarea.

Ridicarea la scara a componentei tehnologice de obtinere a nutreturilor combinate, si anume biomasa de drojdii rosii carotenogena suplimentata cu ioni de zinc si carotenoide a presupus doua etape de lucru: obtinerea inoculului si obtinerea produsului la nivel de statie pilot.

Pentru obtinerea inoculului s-a folosit un mediu constituit din 200 g malt, 20 g srot de soia, 20 g melasa, 500 mL apa si 10% ZnO Green Feed. Pentru obtinerea a 20 kg inocul necesar produsului s-au folosit 5 kg malt, 500 g srot de soia, 500 g melasa, 12,5 litri apa si 1,850 kg ZnO Green Feed. Mediul pentru inocul s-a sterilizat prin autoclavare

15 minute la 121°C, s-a inoculat cultura de *Rhodotorula glutinis* obtinuta pe mediu cu extract de malt cu 10% ZnO si s-a incubat pentru 72 ore la 28°C. S-a obtinut astfel inoculul necesar etapei de obtinere a produsului la nivel de statie pilot.

Obtinerea produsului la nivel de statie pilot s-a realizat pe un mediu natural pe baza de malt, srot de soia, malasa si apa. Pentru obtinerea produsului s-au utilizat 30 kg malt, 3 kg srot de soia, 3 kg melasa, 11 kg ZnO Green Feed si 75 litri apa. Produsul s-a obtinut intr-un bioreactor IL-00 cu o capacitate de 1000 kg, conceput si realizat de INCDBNA Balotesti in colaborare cu INMA Iasi, in cadrul unui proiect de excelenta. Amestecul acestor ingrediente a fost introdus in sterilizatorul bioreactorului si s-a sterilizat prin fierbere timp de 60 minute la 110°C, apoi a fost transferat in fermentator. Dupa ce mediul s-a racit la 28-30°C s-a adaugat inoculul si s-a mentinut 72 de ore la 30°C. S-au obtinut 122 kg produs care a fost uscat la 40°C si macinat pentru a putea fi administrat gainilor ouatoare in amestec cu furajul. Analiza drojdiei din produsul macinat a relevat o concentratie de  $32,5 \times 10^6$  colonii *Rhodotorula glutinis*/g produs.

## **2. Validarea tehnologiei de laborator de obtinere a noilor nutreturi combinate, prin testarea timp de 8 saptamani la nivel de ferma (macrotest) pe gainile ouatoare in vederea obtinerii oului imbogatit in pigmenti carotenoidici**

Partenerul 1 IBNA Balotesti a organizat si desfasurat un experiment (**microtest**) timp de 4 saptamni pe gaini ouatoare (varsta 33 saptamani) impartite in 4 loturi, martor (M) si experimentale (E1; E2 si E3) pentru a evalua efectul noilor solutii nutritionale imbogatite in zinc si carotenoide prin adaos de drojdie cu Zn, asupra performantelor productive ale gainilor datorate carotenoidelor si a calitatii oualor prin imbogatire in ioni de zinc. Ratia administrata lotului martor a fost o ratie conventionala, iar ratiile loturilor experimentale s-au diferentiat de ratia martor prin adaugarea in premix a biomasei de drojdie imbogatita in zinc si carotenoide (72g; 45g si 32g drojdie imbogatita in zinc / 100 kg nutret combinat). Cele mai reprezentative rezultate s-au obtinut in cazul lotului experimental la care s-au adaugat in ratie 72g drojdie imbogatita in zinc si carotenoide /100 kg.

Parametri monitorizati au fost consumul mediu zilnic, productia de oua, greutatea medie a oualor si conversia furajului in ou. La sfarsitul experimentului s-au efectuat recoltari de oua pentru determinarea parametrilor fizici de calitate (greutate ou intreg,

greutate albus, greutate galbenus, greutate coaja, grosimea cojii, rezistenta la spargere, pH albus, pH galbenus, intensitatea culorii galbenusului, unitatea Haugh si gradul de prospetime) si nutritionali (substanta uscata la 65<sup>0</sup>C si 103<sup>0</sup>C, proteina, grasime, cenusa si zinc).

Compozitia chimica primara a nutreturilor combinate testate a fost echilibrata. Cantitatea de proteina a fost de 16.40% (M) si 15.98% (E1), continutul de grasime bruta a fost de 4.16% (M) si 4.53% (E1), respectiv energia bruta a inregistrat valori de 15.20 MJ/kg (M) si de 15.24 MJ/Kg (E1). In schimb, continutul de fier a fost de 534.13 ppm la lotul E1, inregistrand o crestere cu 45.00% fata de lotul martor, iar continutul de zinc a fost de 156.62 ppm la lotul E1, inregistrand o crestere cu 38.49% fata de lotul martor.

Performantele bioproductive inregistrate in decursul celor 4 saptamani de experiment au evidentiat: un consum mediu zilnic de 130.25 g NC/cap/zi la lotul M cu o valoare de 131.64 g NC/cap/zi, usor mai ridicata la lotul E1, fara diferente semnificative ( $p > 0.05$ ); un consum specific asemanator 2.07 kg NC/kg ou la lotul M, respectiv 2.08 kg NC/kg ou la lotul E1; o greutate medie de 65.05 g/ou la lotul M, usor mai scazuta la lotul E1, fara diferente semnificative ( $p > 0.05$ ) si o intensitate de ouat cu valori apropiate de 97.41% la lotul M, respectiv 97.70% la lotul E1.

In ceea ce priveste parametri de calitate externi ai oualor recoltate la sfarsit de experiment diferente semnificative ( $p < 0.05$ ) s-au inregistrat numai la coaja de ou si pH-ul albusului, iar din punct de vedere al compozitiei chimice primare a oualor recoltate la finalul experimentului diferente semnificativ ( $p < 0.05$ ) mai mari s-au inregistrat in cazul oualor recoltate de la lotul experimental (E1) in ceea ce priveste continutul in fier si zinc, inregistrandu-se o crestere cu 7.76% in cazul fierului, respectiv cu 14.81% in cazul zincului, fata de lotul martor (M). In concluzie: s-a obtinut o biomasa de drojdie suplimentata cu microelemente: 0.19  $\pm$  0.03% fier, respectiv 18.67  $\pm$  2.36% zinc; prin adaugarea in premixul ratiei experimentale E1 a 72 g biomasa de drojdie suplimentata cu microelemente s-au obtinut oua cu un continut de 21.10 ppm fier, o crestere cu 7.76%, fata de lotul martor, respectiv 15.27 ppm zinc, o crestere cu 14.81% fata de lotul martor.

Avicola Bucuresti SA a organizat **macrotetul** timp de 4 saptamani, pe doua loturi de 8500 gaini ouatoare Lohmann Brown in varsta de 48 saptamani, folosind in hrana lor o reteta furajera inovativa (E), elaborata de S.C. Avicola Bucuresti, care contine

biomasa de drojdie carotenogena *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033 cu un continut de zinc de 16.74% dezvoltata pe mediu industrial, comparativ cu o reteta conventionala, pentru a obtine oua de consum cu o concentratie crescuta de zinc si carotenoide. Prezenta pigmentilor carotenoidici contribuie la imbunatatirea rezistentei la boli a pasarilor influenteaza pozitiv fertilitatea si rezistenta penajului.

In spatamana de debut a experimentului, cat si in saptamana a doua si finala s-au recoltat cate 15 oua/lot pe care s-au facut determinari privind greutatea oualor si a componentelor lor. Ouale recoltate in ultima saptamana au inregistrat cresteri mai mari in ceea ce priveste greutatea oului (67,30 g) si a componentelor lui (57,21g) comparativ cu lotul martor (64,50 g si respectiv 54,54 g). Comparativ cu lotul experiemntal de 2 saptamani de testare diferentele sunt nesemnificative.

### **3. Determinarea calitatii nutritionale a oualor recoltate pe perioada desfasurarii experimentului la nivel de ferma (macrotest)**

In cadrul macrotestului, evaluarea calitatii nutritionale a oualor s-a realizat prin recoltarea de 15 oua de la fiecare lot de gaini ouatoare si determinarea parametrilor nutritionali reprezentati prin: proteine, grasime, substanta uscata, cenusa si zinc. Determinarile s-au efectuat pentru probe de oua recoltate in a doua saptamana si in cea finala. Prepararea probelor pentru analiza a constat in obtinerea melanjului reprezentat prin amestecul dintre albus si galbenus, uscarea acestuia in etuva, la temperatura de 65<sup>0</sup>C, pana la o umiditate de circa 30% si macinarea lui.

In ceea ce priveste continutul de proteina bruta, respectiv de grasime bruta nu s-au observat diferentieri semnificative intre cele doua loturi, valorile fiind pentru proteina bruta de 50.60% si 50,31% la martor si respectiv la experimental si pentru grasimea bruta de 29,26% si respectiv 29,77%. Diferente semnificative apar la cantitatea de zinc intre probele de melanj de oua obtinute de la lotul experimental (125,56 mg/kg zinc), comparativ cu martorul (40,64% mg/kg).

### **4. Determinari privind incarcatura microbiologica a oualor obtinute la nivel de ferma**

Ouale obtinute la nivel de ferma au fost supuse initial unei examinari exterioare pentru verificarea formei, care trebuie sa fie eliptica cu un pol bont si unul ascutit, a

marimii si a cojii, urmarindu-se integritatea ei (sa nu aiba fisuri sau crapaturi) si culoarea. Coaja trebuie sa fie curata, mata, nepatata si aspra.

Continutul oualor proaspete provenite de la pasari sanatoase este in proportie de 95-99 % lipsit de microorganisme. Conform buletinului de analiza 25350/26.09.2018, ouale recoltate au fost testate pentru *Salmonella spp.* conform SR EN ISO 6579/2003, rezultatul fiind negativ si pentru coaja si pentru continut.

#### **5. Protejarea drepturilor de proprietate intelectuala asupra tehnologiei de obtinere a biomasei carotenogene, asupra solutiilor nutritionale elaborate si testate**

Rezultatele experimentale privind obtinerea biomasei carotenogene imbogatita in oligoelemente (zinc) in mediu lichid si utilizarea acesteia in retete furajere inovative au constituit obiectul cererii de brevet A/00787 din 10.10.2018 cu titlul „Biopreparat pe baza de drojdie carotenogena imbogatita in zinc pentru hrana gainilor ouatoare si procedeu de obtinere si utilizare a acestuia”, autori Camelia Rovinaru, Diana Pasarin, Terez Zarug, in care se revendica: biopreparatul pe baza de biomasa de drojdie carotenogena *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033 cu un continut de zinc de 208.....612 mg/100g biomasa uscata si de  $\beta$ -caroten de 2,4 .....7,1 mg/L; procedeul de obtinere a biopreparatului; reteta furajera de utilizare a biopreparatului pe baza de biomasa de drojdie carotenogena *Rhodotorula glutinis* CCY 020-002-033 imbogatita in zinc pentru obtinerea oului de consum imbogatit in zinc, caracterizata prin aceea ca are in compozitie 0,3g.....7,21g biomasa levuriana la 100g furaj, pentru a asigura continutul maxim de zinc de 150 mg/kg de furaj complet, conform Regulamentului CE nr. 1334/2003

#### **6. Valorificarea si diseminarea pe scara larga a rezultatelor obtinute prin comunicarea si publicarea**

A fost actualizata pagina web. Diseminarea s-a realizat prin prezentarea de comunicari stiintifice sub forma de postere in cadrul simpozioanelor nationale si internationale si articole acceptate spre publicare in Scientific Papers, Series D. Animal Science si Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science” (ISSN: 1338-5178) in numarul din Decembrie - Ianuarie 2018/19, vol. 8, nr. 3.

#### **7. Participare la expozitia nationala (INDAGRA) pentru promovarea noului sortiment de ou de consum imbogatit in pigmenti carotenoidici**

Avicola Bucuresti SA va participa la cel mai mare si important eveniment agricol din Romania, targul INDAGRA (Targ international de produse si echipamente in domeniul agriculturii, horticulturii, viticulturii si zootehniei), organizat de catre ROMEXPO in perioada 31 octombrie – 04 noiembrie 2018. La aceasta manifestare, AVICOLA Bucuresti va prezenta la stand si va promova noul sortiment de ou de consum cu o noua functionalitate, data de continutul ridicat de antioxidanti reprezentati prin pigmenti carotenoidici si de prezenta zincului, cu rol benefic pentru sanatate, dar si cu calitati senzoriale acceptate de consumatori.