



UNIVERSITATEA TEHNICĂ „GHEORGHE ASACHI”
DIN IAȘI FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI PROTECȚIA MEDIULUI

CONCEPEREA DE NOI PARTICULE DE HIDROGEL PE BAZĂ DE BIOPOLIMERI CU APLICAȚII ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ

-Rezumat teză de doctorat –

Conducător științific:

Prof. *em.* dr. ing. *dr.h.c.* Popa Marcel

Doctorand:

Ing.chimist Iurciuc Camelia-Elena (Tincu)

Iași – 2016

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijinul financiar al proiectului „***Sistem integrat de îmbunătățire a calității cercetării doctorale și postdoctorale din România și de promovare a rolului științei în societate***”, ***POSDRU/159/1.5/S/133652*** Beneficiar: Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași.

Proiect finanțat în perioada 2 decembrie 2014- 15 decembrie 2015.

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
RECTORATUL

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de 21.11.2016 la ora 10³⁰ în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**"CONCEPEREA DE NOI PARTICULE DE HIDROGEL PE BAZĂ DE BIOPOLIMERI
CU APLICAȚII ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ"**

elaborată de doamna **IURCIUC CAMELIA-ELENA (TINCU)** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

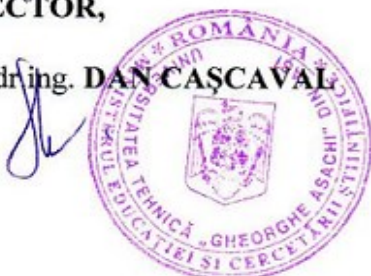
Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|--|------------------------|
| 1. Conf. dr. ing. Irina Volf, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi”, Iași | președinte |
| 2. Prof.em.dr.ing.dr.h.c.Popa Marcel,Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi”, Iași | conducător de doctorat |
| 3. Prof.dr.ing. dr.h.c.Jacques Debrieres, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Franța | referent oficial |
| 4. Prof. dr. ing. Horia Iovu, Universitatea „Politehnica”, București | referent oficial |
| 5. Prof.dr. Patrick Martin, Université d'Artois, IUT Béthune, Franța | referent oficial |

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

RECTOR,

Prof.univ.dr.ing. **DAN CAȘCAVAL**



Secretar universitate,


Ing.Cristina Nagi

Mulțumiri,

Finalizarea tezei de doctorat reprezintă momentul în care se încheie o etapă importantă din pregătirea mea profesională și este rodul unui efort susținut pe parcursul celor 3 ani de studii și cercetări. În realizarea tezei de doctorat am colaborat și am fost îndrumată de oameni cu calități profesionale și umane deosebite cărora doresc să le mulțumesc.

Adresez pe această cale sincere mulțumiri și deosebită recunoștință domnului profesor univ. em. dr. ing.dr.h.c. Popa Marcel, în calitate de conducător științific al acestei teze de doctorat pentru efortul depus și pentru răbdarea de care a dat dovadă în îndrumarea competență și permanentă pe parcursul elaborării și realizării acestei teze de doctorat. De asemenea vreau să-i mulțumesc pentru contribuția sa în formarea mea ca cercetător.

Deosebite mulțumiri domnului profesor univ. dr Patrick Martin pentru îndrumarea în cadrul stagiilor de mobilitate de la Universitatea Artois, IUT Bethune, Franța și pentru sprijinul acordat în elaborarea și prezentarea lucrărilor la conferințele internaționale.

Un rol deosebit în elaborarea și finalizarea tezei de doctorat l-a avut domnul conf. univ. dr. ing. Alexandru Savin și pe această cale vreau să-i mulțumesc pentru sprijinul acordat, pentru sugestiile și comentariile constructive aduse pe parcursul tezei.

Sincere mulțumiri distinșilor membri ai comisiei doamna conf. dr. ing. Irina Volf, domnul prof.dr.ing. Jacques Debrieres, domnul prof. dr. ing. Horia Iovu și domnul prof.dr. Patrick Martin care au avut amabilitatea și disponibilitatea de a analiza și evalua teza de doctorat

Mulțumesc în mod deosebit doamnei sef lucrări dr.bioing. Cătălina Anișoara Peptu pentru sfaturile oferite, pentru ideile sugerate și sprijinului științific acordat în finalizarea tezei.

Prietenei mele Corina Savin vreau să-i multumesc pentru cei 14 ani de prietenie și pentru sprijinul și încurajările oferite pe parcursul doctoratului și nu numai.

Domnului dr.ing. Cornel Stan vreau să-i mulțumesc pentru tot suportul și sfaturile oferite.

Le multumesc tuturor colegilor și prietenilor pentru înțelegerea și prietenia de care au dat dovadă și pentru amintirile frumoase pe care mi le-au dăruit.

Aș vrea să-i mulțumesc în mod deosebit colegului și prietenului meu dr.Călin Andrișoiu pentru tot suportul oferit, pentru că mi-a fost mereu aproape și pentru că m-a impulsionat să obțin rezultate și să finalizez teza de doctorat.

Doresc să le mulțumesc părinților mei deoarece datorită lor sunt acum aici, m-au îndrumat și mi-au fost alături, mi-au insuflat întotdeauna dragostea și respectul pentru muncă și dorința de a evolua continuu.

Pentru răbdarea și iubirea necondiționată de care a dat dovadă, pentru toată liniștea și echilibrul pe care a reușit să mi-l ofere, pentru toată încrederea pe care o are în mine vreau să-i multumesc soțului meu Dan.

În final vreau să dedic aceste realizări tuturor celor care au avut încredere în mine, celor care m-au îndrumat și m-au încurajat.

CUPRINS	Pag.
Introducere	8
Studiu bibliografic	11
Capitolul 1. Tipuri de compuși biologic activi utilizați în industria alimentară	12
1.1. Celule de drojdie	12
1.1.1. Influența ionilor metalici asupra celulelor de drojdie și asupra eficienței proceselor fermentative.	13
1.1.1.1. Magneziul	14
1.1.1.2. Zincul	18
1.1.1.3. Calciul	20
1.1.1.4. Manganul	21
1.1.1.5. Fierul	22
1.1.2. Procese fermentative	22
1.2. Enzime	24
1.2.1. Structura chimică a enzimelor	25
1.2.2. Tipuri de enzime	26
1.2.3. α -Amilaza	27
1.2.3.1. Aplicații ale α -amilazei în medicină	28
1.2.3.2. Aplicații ale α -amilazei în industria alimentară	29
1.2.3.3. Amidonul-substrat pentru hidroliză	29
1.3. Substanțe nutraceutice	31
1.3.1. Tipuri de substanțe nutraceutice utilizate în industria alimentară	31
1.3.2. Curcumina: structură, proprietăți, aplicații	34
1.3.2.1. Separarea curcuminei	35
1.3.2.2. Caracteristici structurale ale curcuminei	37
1.3.2.3. Reactivitatea curcuminei	37
1.3.2.4. Studii farmacologice efectuate pe curcumină	42
Capitolul 2. Polimeri utilizați pentru imobilizarea principiilor active în industria alimentară	44
2.1. Polimeri naturali	44
2.1.1. Proteine	45
2.1.1.1. Proteine din plante	45
2.1.1.2. Proteine de origine animală	47
2.1.2. Polizaharide	49
2.1.2.1. Gelanul	50
2.1.2.2. Derivați celulozici	62
2.1.2.3. Chitina/Chitosanul	66
2.1.2.4. Caragenanul	69
2.1.2.5. Alginații	71
2.1.2.6. Polimeri sintetici	73
Capitolul 3. Metode de imobilizare	74
3.1. Metoda extruderii sau a gelifierii ionice	75
3.2. Metoda emulsiei	78
3.3. Coacervarea	79
3.4. Uscarea prin pulverizare	81
3.5. Alte metode de formare a micro/nanoparticulelor	82
3.5.1. Obținerea particulelor din polimeri preformați	82
3.5.2. Obținerea micro/nanoparticulelor prin reticularea polimerilor în soluție /suspensie	82
3.5.3. Metoda reticulării termice	82
3.5.4. Metoda micelilor inverse	83
3.5.5. Chelatizarea	83

3.5.6. Coalescența picăturilor de emulsie	83
3.5.7. Procedul spray – chilling (pulverizare-congelare)	84
3.5.8. Procedul spray - cooling (pulverizare – răcire)	84
3.5.9. Procedul în pat fluidizat – (bed coating)	84
3.5.10. Extruderea centrifugală	85
3.5.11. Procedul de extracție /evaporare a solventului	85
3.5.12. Procedul sitării/sortării	85
3.5.13. Procedul de depunere strat cu strat (layer by layer)	86
Capitolul 4. Metode de imobilizare a principiilor active cu utilizări în industria alimentară	87
4.1. Imobilizarea celulelor de drojdie de bere	90
4.2. Metode de imobilizare a α -amilazei	93
4.3. Metode de imobilizare a curcuminei	93
4.3.1. Complecși cu ciclodextrine	93
4.3.2. Complecși cu fosfatidilcolină	94
4.3.3. Nanoparticule lipidice	94
4.3.4. Lipozomi	95
4.3.5. Micro/nanoemulsii	95
4.3.6. Imobilizarea în particule de polimer	97
REZULTATE PROPRII	98
Obiectivele lucrării	99
Capitolul 5. Materiale, tehnici experimentale, metode de caracterizare	100
5.1. Materiale	100
5.2. Tehnici experimentale	103
5.2.1. Prepararea particulelor conținând celule de drojdie de bere imobilizate în matrici polimere (polizaharide).	106
5.2.2. Prepararea particulelor conținând α -amilază imobilizată în matrice de gelan.	107
5.2.3. Prepararea particulelor conținând curcumină imobilizată în matrici de polizaharide	109
5.3. Tehnici de caracterizare	109
5.3.1. Spectroscopia FTIR-ATR	109
5.3.2. Morfologia particulelor (microscopie electronică de baleiaj)	109
5.3.3. Stabilitatea structurală a particulelor conținând drojdie de bere	110
5.3.4. Stabilitatea în diferite medii a sistemelor particulate conținând drojdie de bere	111
5.3.5. Gradul de umflare	112
5.3.6. Viabilitatea celulară și concentrația celulelor de drojdie din medii apoase și din particulele de imobilizat	115
5.3.7. Testarea activității fermentative a particulelor ce conțin celule de drojdie.	116
5.3.8. Determinarea activității α -amilazei libere și imobilizate	118
5.3.9. Determinarea constantei Michaelis-Menten și a vitezei maxime de hidroliză α -amilaza liberă și imobilizată	119
5.3.10. Influența pH-ului și a temperaturii asupra activității enzimaticice	120
5.3.11. Testarea activității enzimaticice a particulelor conținând enzimă imobilizată, în mai multe cicluri hidrolitice	120
5.3.12. Cinetica eliberării curcuminei din particulele de imobilizat	121
Capitolul 6. Obținerea de sisteme particulate pe bază de polizaharide reticulate ionice conținând celule de drojdie	122
6.1. Particule pe bază de gelan reticulat cu clorura de calciu conținând celule de drojdie imobilizate	123
6.1.1. Teste preliminare de obținere a particulelor de hidrogel	125
6.1.2. Stabilitatea particulelor și viabilitatea celulară	127
6.1.3. Gradul de umflare	130
6.1.4. Morfologia particulelor	131

6.1.5. Activitatea fermentativă a biorectoarelor	132
6.1.6. Evaluarea viabilității celulare și a cantității de celule din particule după fiecare ciclu de fermentare	137
6.1.7. Productivitatea specifică și viteza de fermentare	138
Concluzii	139
6.2. Particule pe bază de gelan reticulat cu acetat de magneziu conținând celule de drojdie de bere imobilizate	139
6.2.1. Morfologia particulelor	143
6.2.2. Stabilitatea în apă și viabilitatea celulară	144
6.2.3. Stabilitatea în soluții alcoolice și viabilitatea celulară	146
6.2.4. Caracteristicile de umflare în apă	147
6.2.5. Stabilitatea mecanică a particulelor evaluată prin teste reologice	149
6.2.6. Testarea activității fermentative a imobilizatorilor	151
Concluzii	158
6.3. Particule pe bază de gelan reticulat cu acetat de zinc conținând celule de drojdie de bere imobilizate	159
6.3.1. Stabilitatea particulelor și viabilitatea celulară	162
6.3.2. Stabilitatea mecanică a particulelor	164
6.3.3. Gradul de umflare	166
6.3.4. Morfologia particulelor	167
6.3.5. Activitatea fermentativă a particulelor ce conțin celule de drojdie	169
6.3.5.1. Influența concentrației de agent de reticulare din preextrudat.	169
6.3.5.2. Influența concentrației de acetat de zinc din baia de extrudare	171
6.3.5.3. Influența timpului de păstrare a particulelor în baia de extrudare	172
6.3.5.4. Influența pH-ului din baia de fermentare	173
6.3.5.5. Influența concentrației de acetat de zinc din baia de fermentare	175
6.3.6. Productivitatea specifică și viteza de fermentare	180
Concluzii	181
6.4. Particule pe bază de amestecuri de gelan și carboximetil celuloză reticulate cu acetat de zinc, conținând celule de drojdie de bere imobilizate	182
6.4.1. Evaluarea stabilității și a viabilității celulare	185
6.4.2. Gradul de umflare în apă	187
6.4.3. Morfologia particulelor	189
6.4.4. Evaluarea capacității de fermentare a glucozei în prezența imobilizatorilor obținute în diferite condiții	190
6.4.5. Productivitatea specifică și viteza de fermentare	193
Concluzii	194
6.5. Particule pe bază de amestecuri de gelan, carboximetil celuloză și caragenan reticulate cu acetat de zinc, conținând celule de drojdie de bere imobilizate.	194
6.5.1. Caracterizarea particulelor prin spectroscopie FTIR-ATR.	198
6.5.2. Stabilitatea în timp a particulelor fără celule de drojdie în diferite medii (apoase).	200
6.5.3. Stabilitatea în timp a particulelor cu celule de drojdie imobilizate – evaluarea concentrației de celule difuzate și a viabilității celulare.	201
6.5.4. Capacitatea particulelor de a reține apa.	204
6.5.5. Morfologia particulelor.	206
6.5.6. Testarea activității fermentative a particulelor ce conțin celule de drojdie.	208
6.5.7. Evaluarea viabilității celulare și a cantității de celule din particule după fiecare ciclu de fermentare.	214
6.5.8. Productivitatea specifică și viteza de fermentare.	219

Concluzii	220
Capitolul 7. Imobilizarea α -amilazei în particule de gelan reticulat ionic.	222
7.1. Morfologia particulelor cu α -amilază imobilizată	226
7.2. Capacitatea de umflare în mediu apos	227
7.3. Caracterizarea enzimei libere	228
7.4. Determinarea constantei Michaelis-Menten și a vitezei maxime de hidroliză	229
7.5. Influența pH-ului și a temperaturii asupra activității enzimei libere și imobilizate	231
7.6. Testarea activității enzimatică a enzimei imobilizate în mai multe cicluri hidrolitice	233
Concluzii	234
Capitolul 8. Imobilizarea curcuminei în particule pe bază de polizaharide complexate polielectrolitic și reticulate ionic cu acetat de magneziu	238
8.1. Morfologia particulelor	239
8.2. Capacitatea de umflare în medii apoase	240
8.3. Cinetica de eliberare a curcuminei din particule	242
Concluzii	243
Concluzii generale	244
Bibliografie	250

Rezumatul cuprinde principalele rezultate originale. Numerotarea capitolelor, figurilor, tabelelor și ecuațiilor precum și a referințelor bibliografice corespunde cu cea din teza de doctorat.

Introducere

Procesele biocatalitice stau la baza a numeroase tehnologii utilizate în prezent nu doar în industria alimentară, ci și cea farmaceutică, cosmetică sau chiar chimică determinând o preocupare continuă a cercetătorilor din domeniu.

Biotehnologiile utilizate în industria alimentară apelează frecvent la compuși biologic activi ce catalizează fermentarea sau hidroliza unor substraturi prin a căror transformare se obțin produși de mare interes și utilitate. De cele mai multe ori, procesele tehnologice la care se apelează sunt discontinue, iar biocatalizatorul – fie microorganism, celulă, enzimă – este greu de îndepărtat din mediul de reacție, nu mai poate fi reutilizat ca orice alt catalizator clasic, complică operațiile de purificare pentru obținerea unui produs pur, așa cum impune utilizarea sa ca aliment.

Aceste câteva aspecte explică cercetările continue care se fac în domeniu, ce se referă în esență la imobilizarea diferitelor tipuri de biocatalizatori pe suporturi netoxice, conducând la realizarea de noi formulări ușor de recuperat din mediile în care lucrează, capabile de a fi reutilizate de un număr mare de ori în procese discontinue, sau de utilizare o durată mai mare de timp în procese continue.

O categorie importantă de produse de interes nu doar din punct de vedere alimentar ci și prin beneficiile aduse sănătății sunt nutraceuticele – îmbinare originală a doi termeni: ”nutriție” și ”farmaceutic”. Solubilitatea și biodisponibilitatea adeseori reduse ale acestora impun realizarea de formulări care să le îmbunătățească aceste caracteristici.

Pornind de la aceste premize, teza de doctorat își propune să aducă contribuții originale pe trei direcții:

- obținerea de particule pe bază de polizaharide ionice gelificate ionotrop, conținând celule de drojdie de bere imobilizate, caracterizarea și testarea lor în procese de fermentare a glucozei;
- obținerea de particule pe bază de gelan, reticulat ionic, conținând α -amilază imobilizată, caracterizarea lor și testarea în procesul de hidroliză a amidonului;
- realizarea unei noi formulări nutraceutice prin încapsularea curcuminei în particule pe bază de polizaharide ionice cu caracter diferit, complexate polielectrolitic și prin gelifiere ionotropă, caracterizarea lor și testarea din punct de vedere al capacității de eliberare controlată/susținută a principiului activ.

Teza este structurată în două părți, prima constituind-o un studiu bibliografic extins asupra problemelor abordate în cea de a doua parte a lucrării, care prezintă rezultate proprii obținute în urma cercetărilor efectuate. Lucrarea se întinde pe 300 pagini, conține un număr de 89 figuri, 44 tabele, 9 relații de calcul, încheindu-se cu concluziile generale și cu lista referințelor bibliografice.

Studiul bibliografic este prezentat pe parcursul a 4 capitole ce tratează probleme privind compușii biologic activi de interes pentru industria alimentară (cap. 1), polimerii utilizați ca suport pentru imobilizarea acestora (cap. 2), tipurile de particule utilizabile pentru încapsularea/includerea lor (cap. 3) și metodele generale de imobilizare a compușilor biologic activi cu aplicații în industria alimentară (cap. 4).

Capitolul 5 prezintă materialele, tehnicile de lucru și de caracterizare utilizate.

Capitolul 6 deschide seria celor 3 capitole care raportează rezultatele originale obținute în cadrul lucrării. Având o extindere mai mare, el tratează pe parcursul a 5

subcapitole diferite tipuri de imobilizate pentru celule de drojdie de bere, obținute utilizând polizaharide ionice și diferiți agenți reticulanti de tipul cationilor metalici divalenți. Primele trei subcapitole prezintă imobilizate pe bază de gelan reticulat cu cationi de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} relevând caracteristicile morfologice, fizico-chimice și biochimice ale acestora. Următoarele subcapitole discută obținerea de particule pe bază de amestecuri de polizaharide (binar, ternar) – gelan, carboximetil celuloză sare de sodiu, caregenan -, relevând ca și anterior proprietățile imobilizatelor cu accent pe capacitatea de a cataliza fermentarea glucozei.

Capitolul 7 prezintă obținerea prin procedeul amintit anterior și caracterizarea fizico-chimică și din punct de vedere al acțiunii biocatalitice, a unor particule pe bază de gelan conținând imobilizată α -amilaza.

Ultimul capitol (8) se referă la obținerea unei noi formulări nutraceutice conținând curcumină, având comun cu cele precedente suportul polimeric pentru imobilizare (polizaharide ionice) și parțial metode de obținere care implică însă nu doar gelifierea ionotropă ci și complexarea polielectrolitică. Particulele obținute sunt caracterizate morfologic, fizico-chimic și din punct de vedere al capacității de includere dar îndeosebi de eliberare a curcuminei.

La finalul lucrării sunt prezentate concluziile generale și lista bibliografică.

Rezultatele cercetărilor efectuate au fost valorificate prin elaborarea a 10 lucrări științifice care se află în următoarele stadii:

- 3 lucrări publicate (2 în reviste cu coeficient de impact)
- 2 lucrări acceptate pentru publicare (1 în revistă cu coeficient de impact)
- 7 lucrări redactate, trimise la reviste cu coeficient de impact
- 13 comunicări la manifestări științifice interne (2) și internaționale (11) între care 7 comunicări orale.
-

Obiective

Obiectivul principal al tezei de doctorat îl constituie obținerea unor sisteme particulare cu caracter de hidrogel, pe bază de polizaharide reticulate ionic, destinate imobilizării de principii active cu potențiale aplicații în industria alimentară.

Realizarea obiectivului principal a presupus îndeplinirea mai multor obiective asociate, precizate în cele ce urmează.

- * Elaborarea unei metode de obținere a unor particule pe bază de gelan sau amestecuri ale acestuia cu alte polizaharide, destinate includerii de principii active de interes pentru industria alimentară, prin gelifiere ionotropă în prezența unor cationi metalici divalenți.
- * Caracterizarea fizico-chimică a particulelor obținute prin metode adecvate scopului pentru care au fost preparate, respectiv obținerea de bioreactoare pentru fermentarea glucozei
- * Obținerea de sisteme particulare conținând celule de drojdie imobilizate în matricea de tip hidrogel și stabilirea parametrilor optimi de lucru pentru realizarea de sisteme stabile, cu performanțe bune în fermentarea glucozei
- * Caracterizarea sistemelor particulare conținând celule de drojdie imobilizate în matricea de hidrogel, din punct de vedere al stabilității structurale, al activității biocatalitice și al posibilității de utilizare repetată în cicluri de fermentare a glucozei.

- * Obținerea de sisteme particulare pe bază de gelan, obținute prin gelifiere ionotropă cu cationi metalici divalenți, conținând α -amilază imobilizată; caracterizarea lor fizico-chimică și din punct de vedere al activității biologice în procesul de hidroliză a amidonului
- * Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unor sisteme particulare pe bază de complecși polielectrolitici de natură polizaharidică conținând curcumină imobilizată; studiul procesului de eliberare in vitro a principiului activ.

Rezultate originale

Capitolul 5

MATERIALE, TEHNICI EXPERIMENTALE, METODE DE CARACTERIZARE

5.1. Materiale

Materialele și reactivii utilizați pentru efectuarea studiilor au fost achiziționate de la firme specializate în producerea lor și sunt de puritate analitică. În continuare sunt prezentate selectiv cele mai importante materiale utilizate în studiul întreprins.

Pentru studiile efectuate s-a utilizat gelanul (Kelkogel), carboximetil celuloza (CMCNa) (Sigma Aldrich și are un grad de substituție de 75%), I-caragenanul, chitosanul (este procurat de la Sigma Aldrich, are o masă moleculară medie și un grad de deacetilare de 75%), acetat de magneziu, acetatul de calciu, acetatul de zinc, clorura de calciu, sulfatul de sodiu, drojdie comercială de panificație, de gen *Saccharomyces cerevisiae*, cu un conținut de 70% apă, procurată de la Pakmaya, curcumina pudră, α -amilază, amidonul solubil, α -D-glucoza anhidră, albumina serică bovină, tween 20.

5.2. Tehnici experimentale

5.2.1. Prepararea particulelor conținând celule de drojdie imobilizate în matrici polimere (polizaharide).

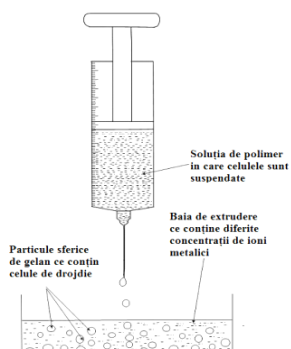


Fig.18. Prezentare schematică a procesului de obținere a particulelor din polizaharide conținând celule de drojdie imobilizate, prin gelifiere ionotropă, utilizând procedeul extruderii prin capilară.

Modul de lucru este următorul. 0.25 g polimer (amestec de polimeri) se dizolvă în 25 ml apă bidistilată, sub agitare, la temperatura de 70-80°C. Întrucât soluția de polimer este destul de fluidă și nu formează particule stabile la picurarea în baia de reticulant ionic, se procedează la prereticularea polimerului/amestecului de polimeri, anterior extruderii, prin adăugarea unui volum de soluție agent de reticulare (clorură sau acetat al metalului divalent) de diferite concentrații, când se obține un fluid vâscos, posibil a fi extrudat. Soluția se răcește la 30°-35°C, iar apoi se extrude în picături cu ajutorul unei seringi printr-un ac cu diametrul de 23 Gauge și lungimea de 30 mm, la presiune de apăsare constantă a pistonului seringii, în 125

ml soluție de agent de reticulare de diferite concentrații. Particulele sferice se formează instantaneu la contactul picăturilor cu soluția de acetat al metalului divalent din baia de coagulare, fiind lăsate pentru maturare în soluția de extrudare timp de 2 ore, după care sunt spălate cu apă bidistilată pentru îndepărtarea excesului de agent de reticulare.

Particulele conținând celule de drojdie imobilizată s-au obținut similar, după adăugarea prealabilă în soluția de polimeri ce urmează a fi extrusă, a unei suspensii de drojdie (1.25 g drojdie conținând 0.375 g celule, în 5 ml apă), la temperatura de 40°C, asigurând astfel un raport masic drojdie/polimer de 5/1 (g/g). Particulele cu celule de drojdie sunt ținute pentru maturare timp de 1 oră în soluția din baia de coagulare, după care sunt separate prin filtrare, se spală pe filtru cu trei porții de câte 100 ml apă bidistilată și se păstrează în recipiente închise, la o temperatură cuprinsă între 4-6°C, până la caracterizarea și testarea lor ulterioară.

Prepararea fiecăruia dintre imobilizatele de celule în diferite matrici de polizaharide prezintă unele particularități și sunt prezentate în următoarele capitole. S-au preparat următoarele tipuri de particule:

- particule cu celule de drojdie imobilizate în matrice de gelan reticulate cu Ca^{2+} .
- particule cu celule de drojdie imobilizate în matrice de gelan reticulate cu Mg^{2+} .
- particule cu celule de drojdie imobilizate în matrice de gelan reticulate cu Zn^{2+} .
- particule cu celule de drojdie imobilizate în matrice de gelan în amestec cu carboximetil celuloză (sare de sodiu), reticulate cu Mg^{2+}
- particule cu celule de drojdie imobilizate în matrice de gelan în amestec cu carboximetil celuloză (sare de sodiu) și caragenan reticulate cu diferiți cationi divalenți.

5.2.2. Prepararea particulelor conținând α -amilază imobilizată în matrice de gelan.

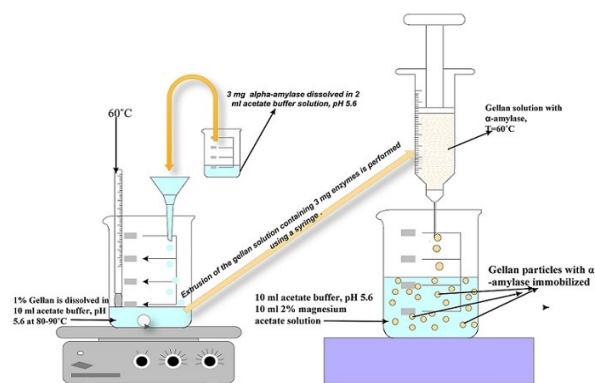


Figura 19. Prezentare schematică a preparării particulelor de gelan cu α -amilază imobilizată

Particulele de gelan cu α -amilază imobilizată au fost obținute prin reticulare ionică cu acetat de magneziu, utilizând metoda extruderii. Schematic, procesul de obținere este prezentat în figura 19. S-a lucrat cu mai multe concentrații de α -amilază pentru a determina concentrația optimă care poate fi imobilizată în particule de gelan.

0.1 g gelan (1%) au fost dizolvate la temperatura de 80-90°C, sub agitare, în 10 ml soluție tampon acetat care are un pH de 5.6. Soluția astfel obținută se răcește până la temperatura de 60°C când se adaugă sub agitare cantitatea de α -amilază dizolvată în 2 ml soluție tampon acetat, pH 5.6. Baia de gelifiere ionotropă conține 10 ml soluție tampon acetat și 10 ml soluție acetat de magneziu de concentrație 2%. Extruderea se efectuează în picături

cu ajutorul unei seringi, la temperatura de 60°C (la o temperatură mai mică soluția de gelan astfel obținută devine foarte vâscoasă iar activitatea enzimatică a α -amilazei scade). La contactul cu soluția de reticulant, picăturile extruse se transformă instantaneu în particule sferice, umflate. Particulele cu α -amilază imobilizată obținute se păstrează la frigider la temperatura de 4-6°C până la efectuarea testelor ulterioare.

5.2.3. Prepararea particulelor conținând curcumină imobilizată în matrici de polizaharide

Au fost utilizate două tehnici de realizare a sistemelor particulate polimer-curcumină, ambele având la bază realizarea de complecși polielectrolitici între polizaharide cu caracter ionic diferit.

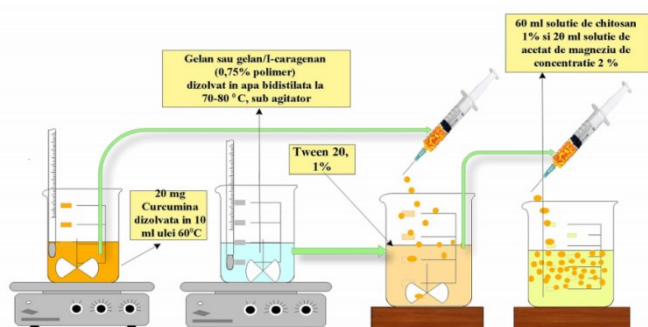


Figura 20. Prezentarea schematică a procesului de obținere a particulelor cu curcumină prin metoda emulsiei și a complexării polielectrolitice.

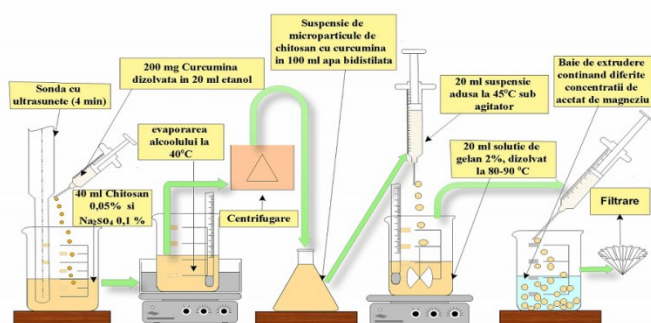


Fig. 21. Prezentarea schematică a procesului de obținere a particulelor de gelan ce conțin microparticule de chitosan cu curcumină imobilizată, reticulate ionic cu acetat de magneziu, prin metoda extruderii.

Prima metodă se referă la realizarea particulelor pe bază de gelan, respectiv gelan/caragenan prin complexare polielectrolitică cu chitosan, fiind prezentată schematic în figura 20.

O cantitate de 20 mg curcumină se dizolvă în 10 ml ulei de măsline sub agitare, la 60°C. Soluția de polimer (concentrație de 0.75% gelan sau gelan/i-caragenan) se prepară separat prin dizolvarea a 1.5 g polimer în 20 ml apă distilată, sub agitare, la temperatura de 80-90°C. Soluția uleioasă de curcumină se emulsionează prin adăugare în picături în soluția apoasă de polizaharidă, după ce în aceasta din urmă se adaugă 1% Tween 20 (surfactant). Emulsionarea are loc sub agitare energetică (2000 rot/min), timp de 30 minute. Emulsia formată se extrude apoi cu ajutorul unei seringi și a unui ac cu dimensiunea de 23 Gauge într-o soluție de 60 ml chitosan 1% (1% chitosan dizolvat în 1 % acid acetic) ce conține și 20 ml soluție de acetat de magneziu 2%. Particulele se lasă în amestecul rezultat, la frigider, la temperatura de 4-6°C pentru 4-5 ore pentru stabilizare după care se filtrează și se spală cu apă bidistilată pentru îndepărtarea excesului de chitosan și acetat de magneziu. Uscarea particulelor se

efectuează la vid la temperatura de 30°C, după care acestea se păstrează în recipiente închise până la efectuarea caracterizărilor ulterioare.

A doua metodă utilizată pentru imobilizarea curcuminei în particule de polizaharide se bazează, de asemenea, pe formarea unui complex polielectrolitic fiind prezentată schematic în figura 21. Metoda presupune parcurgerea a două etape pentru obținerea particulelor.

Etapa I. Prepararea microparticulelor de chitosan cu curcumină imobilizată.

În această etapă 200 mg curcumină se dizolvă în 20 ml alcool etilic absolut. Se prepară separat o soluție de chitosan 0,05% în 0,06 M acid acetic (40 ml), în care se adaugă o soluție de Na₂SO₄ de concentrație 0,1% (16 ml). Amestecul este supus ultrasonării (sondă de ultrasunete tip Sonics and Materials, Vibra Cell) timp de 4 minute, cu adăugarea în picături a curcuminei dizolvată în alcool etilic.

Suspensia de particule de chitosan reticulat ionic astfel rezultată, este menținută la 40°C sub agitare pentru evaporarea alcoolului etilic, după care separarea microparticulelor se efectuează prin centrifugare. Final, microparticulele se spală de trei ori cu apă bidistilată și se resuspendă în 100 ml apă bidistilată. Suspensia rezultată, dacă nu este folosită imediat se păstrează la T = 4-6°C până la utilizarea în următoarea etapă.

Etapa II. Prepararea particulelor de hidrogel pe bază de gelan conținând microparticule de chitosan.

Gelanul se dizolvă în 20 ml apă bidistilată la 80-90°C, pentru obținerea unei soluții de concentrație 2%. Când se ajunge la temperatura 50°C se adaugă sub agitare puternică (2000 rot/min), în picături, 20 de ml din suspensia de microparticule de chitosan cu curcumină, preparată în etapa I. Amestecul format se extrude cu ajutorul unei seringi printr-un ac cu diametrul de 23 Gauge în 100 ml soluție acetat de magneziu de concentrație 2%. Se formează simultan complexul polielectrolitic și aree loc și reticularea gelanului. Particulele de complex formate se păstrează în soluția de reticulare timp de 3 ore după care sunt separate prin filtrare. Uscarea particulelor se face la temperatura camerei, la 25°C, după care acestea se păstrează în recipiente etanșe, la rece, până la efectuarea caracterizărilor.

5.3. Tehnici de caracterizare

5.3.1. Spectroscopia FTIR-ATR

5.3.2. Morfologia particulelor (microscopie electronică de baleiaj)

5.3.3. Stabilitatea structurală a particulelor conținând drojdie

5.3.4. Stabilitatea în diferite medii a sistemelor particulate conținând drojdie

5.3.5. Gradul de umflare

5.3.6. Viabilitatea celulară și concentrația celulelor de drojdie din medii apoase și din particulele de imobilizat

5.3.7. Testarea activității fermentative a particulelor ce conțin celule de drojdie.

5.3.8. Determinarea activității α -amilazei libere și imobilizate.

5.3.9. Determinarea constantei Michaelis-Menten și a vitezei maxime de hidroliză α -amilaza liberă și imobilizată

5.3.10. Influența pH-ului și a temperaturii asupra activității enzimaticice

5.3.11. Testarea activității enzimaticice a particulelor conținând enzimă imobilizată, în mai multe cicluri hidrolitice

5.3.12. Cinetica eliberării curcuminei din particulele de imobilizat

Capitolul 6

Obținerea de sisteme particulare pe bază de polizaharide reticulate ionic conținând celule de drojdie imobilizate

Imobilizarea celulelor de drojdie este încă mult explorată în industria alimentară pentru producerea vinului și a berii în procese fermentative continue. Sistemele particulare sferice conținând celule de drojdie de bere pot fi considerate adevărate bioreactoare de mici dimensiuni, ceea ce a impus utilizarea acestui termen - pe care îl vom folosi adeseori pe parcursul lucrării - în literatura de specialitate.

Rezultatele cercetărilor noastre au fost grupate în 5 subcapitole, funcție de natura ionului metalic utilizat ca reticulant sau de natura suportului (polizaharidă simplă sau amestecuri de polizaharide).

6.1. Particule pe bază de gelan reticulat cu clorura de calciu conținând celule de drojdie imobilizate

CaCl_2 a fost ales ca agent de reticulare în acest studiu deoarece ionii de calciu pot avea un rol în protejarea celulelor de drojdie împotriva efectelor toxice produse de etanol la fel ca și ionii de magneziu sau zinc. Ionii de calciu, dacă sunt suplimentați în concentrații mari, pot înlocui magneziul într-o serie de căi biochimice ceea ce poate conduce la o creștere celulară și păstrarea viabilității celulare.

Formarea rețelei polimere care include în ochiurile sale celulele de drojdie, are la bază interacțiunile ionice realizate între grupările carboxilat ale gelanului și ionii de Ca^{2+} .

Ionul de calciu poate adera la membrana plasmatică celulară când este încărcată negativ, conferindu-i acesteia mai multă stabilitate la factorii de stres care pot interveni în procesele fermentative [28, 31]. În acest mod, celulele de drojdie pot participa la ranforsarea rețelei, crescându-i astfel stabilitatea mecanică.

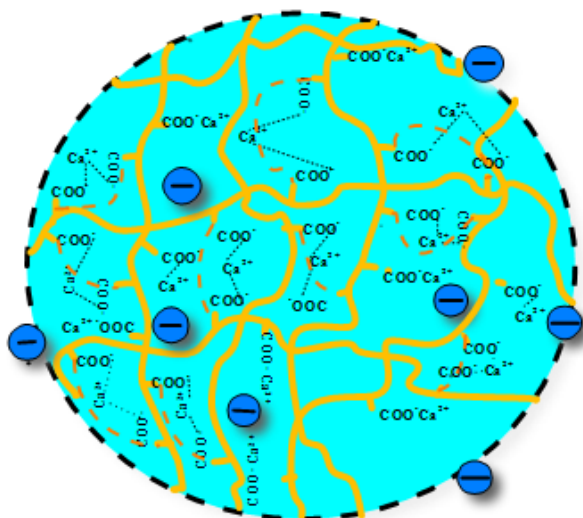


Fig. 32. Reprezentarea schematică a rețelei de gelan reticulat ionic, conținând celule de drojdie în ochiurile sale.

Tabel 10. Programul experimental și codul probelor *

Proba		Concentrația soluției de CaCl_2 la pre-extrudere (% w/v)**	Concentrația soluției de CaCl_2 în baia de coagulare (% w/v)***
Fără celule	Cu celule		
	PD1	0.1	2
P2	PD2	0.3	2
	PD3	0.4	2
	PD4	0.5	2
P5	PD5	0.3	3
P6	PD6	0.3	4

*25 mL soluție de gelan, $c = 1\%$ (w/v)

**1.25 mL soluție de clorură de calciu

***125 mL ml soluție de clorură de calciu

6.1.2. Stabilitatea particulelor și viabilitatea celulară

Valorile transmitanței supernatantului în care s-au păstrat particulele după extrudere constituie o măsură a stabilității structurale a acestora. S-a urmărit în studiul efectuat influența mai multor factori asupra stabilității particulelor cu și fără drojdie imobilizată cum ar fi: influența concentrației de clorură de calciu din baia de extrudere, influența concentrației din preextrudat și influența mediului alcoolic asupra stabilității particulelor și s-au obținut următoarele rezultate prezentate în tabelele 11, 12, 13 și 14.

Valorile mari ale transmitanței atestă faptul că particulele sunt stabile. Stabilitatea lor crește cu creșterea gradului de reticulare. Stabilitatea particulelor scade ușor în timp. Se observă că pentru particulele care conțin celule de drojdie imobilizate valorile transmitanței sunt mai mari față de cele care nu conțin celule de drojdie. Acest rezultat constituie și un argument indirect că celulele incluse în rețeaua hidrogelului interacționează cu ionii de Ca^{2+} , stabilizând structura particulei.

Tabel 11. Valorile transmitanței pentru două medii în care au fost păstrate particulele cu și fără drojdie după extrudere, la diferite durate.

Proba	Transmitanța (%)					
	In soluția din baia de coagulare		In apă bidistilată			
			12 h.	24 h.	36 h.	48 h
P2	95.6	95.2	99.1	98.3	97.5	95.9
P5	96.5	95.4	99.4	98.5	97.9	96.1
P6	96.5	95.6	99.8	99.2	98.7	96.3

Tabel 12. Influența concentrației soluției de CaCl_2 utilizată la pre-extrudere și a duratei de păstrare asupra stabilității particulelor și a viabilității celulare.

Proba	Transmitanța (%)				Concentrația celulelor (nr. celule/ml) $\times 10^4$ în supernatant				Viabilitatea celulară, %			
	În soluția de CaCl_2 din baia de coagulare		În apă bidistilată		În soluția de CaCl_2 din baia de coagulare		În apă bidistilată		În soluția de CaCl_2 din baia de coagulare		În apă bidistilată	
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
PD1	97.9	95.9	99.2	98.3	7.75	9	3.5	4	100	97.3	100	94.1
PD2	97.9	97	99.4	98.8	10	13	3.5	5.5	100	98.1	100	95.6
PD3	98.7	93.4	98.7	97.4	17.5	42.5	10.5	13.3	100	98.8	97.7	96.7
PD4	93	91.5	97.6	97	30	45	13	16.3	99.2	98.4	98.1	95.6

Tabel 13. Influența concentrației soluției de CaCl_2 din baia de coagulare și a duratei de păstrare asupra stabilității particulelor cu celule de drojdie și a viabilității celulare

Proba	Transmitanța (%)					Concentrația celulelor (nr. celule/ml) $\times 10^4$ în supernatant			Viabilitatea celulară, %		
	În soluția de CaCl_2 din baia de coagulare		În apă bidistilată			În soluția de CaCl_2 din baia de coagulare		În apă bidistilată		În soluția de CaCl_2 din baia de coagulare	
	12h	24h	12h	24h	36h	24h	12h	36h	24h	24h	36h
PD2	96.8	96	99.3	98.3	97.8	35	3.3	15	97.9	97	95.2
PD5	97	96.1	99.4	98.7	98.3	26.5	3.3	13.8	97.2	97	94.8
PD6	97.5	96.2	99.4	98.8	98.5	20	3	9.75	96.4	93.9	92.9

Tabelul 14. Influența mediului alcoolic asupra stabilității în timp a particulelor și viabilității celulelor de drojdie.

Proba	Transmitanța (%)				Concentrația celulelor de drojdie în supernatant (nr. celule /ml x)				Viabilitatea celulară, %			
	12h	36h	60 h	84h	12h	36h	60h	84h	12h	36h	60 h	84h
PD2	97.8	96.6	95.8	94.7	16.3	20	25.8	38.3	98.5	96.4	97.2	96.8
PD5	98.4	97.4	96.8	96.1	8.8	12	14.3	21.3	97.2	96	95	94.4
PD6	98.7	97.8	97.3	96.5	8.3	10.5	11	18.8	97.1	95.5	95.7	93.8

Numărul de celule care difuzează din particule este mic datorită faptului că celulele sunt bine prinse în rețeaua polimeră. Viabilitatea celulară scade și ea în timp, dar valorile rămân ridicate ($>90\%$). Concentrații mai mari de celule difuzate se constată după 24h în soluția de coagulare, înainte de transferul în apă bidistilată. Particulele conținând celule de drojdie imobilizate sunt stabile în mediul alcoolic, ceea ce este o condiție importantă pentru utilizarea lor în cicluri fermentative repetate.

6.1.3. Gradul de umflare

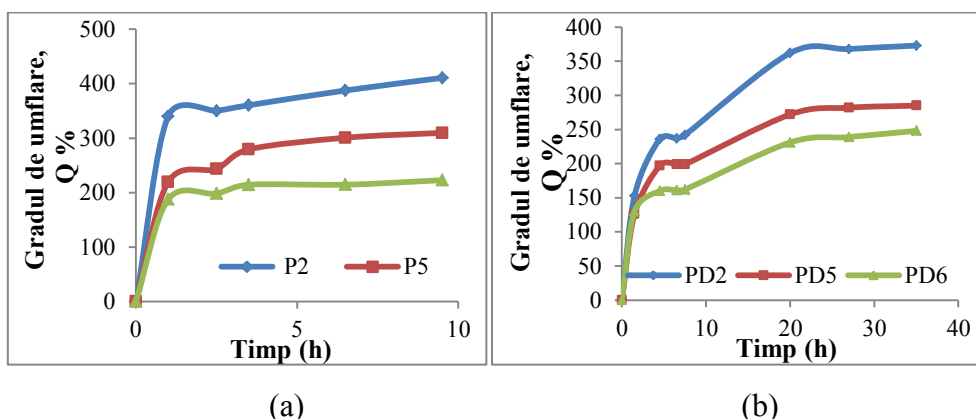


Figura 33. Variația gradului de umflare în apă, în timp, pentru particule de gelan fără (a) și cu (b) celule de drojdie imobilizate, obținute în diferite condiții de extrudare

S-a considerat util determinarea gradului de umflare deoarece particulele au caracter de hidrogel iar difuzia glucozei și a produșilor de fermentare este influențată de capacitatea particulelor de a se umfla în mediul apos.

Gradul maxim de umflare ca și viteza procesului (panta porțiunii liniare a curbelor) scad cu creșterea concentrației reticulantului din baia de coagulare. Trebuie notat, de asemenea, că valorile maxime ale umflare pentru particulele conținând celule de drojdie imobilizate sunt mai coborâte decât ale particulelor fără celule (fig. 33 b), pentru aceleași condiții de extrudare. Efectul este datorat, evident, interacției suprafeței negative a celulelor cu ioni de Ca^{2+} , ceea ce contribuie suplimentar la reticularea matricii, după cum s-a mai discutat anterior.

6.1.4. Morfologia particulelor

Informații importante referitoare la morfologia particulelor, atât fără cât și cu celule imobilizate, au fost aduse de analiza prin microscopie electronică de baleiaj. Fotografiiile au fost realizate în secțiune, atât la probe umflate în apă cât și uscate, pentru mai multe particule, dar pentru ilustrare au fost alese doar cele referitoare la particulele P2, respectiv PD2, fiind prezentate în fig. 34. Se constată că particulele fără celule de drojdie (fig. 34, A) prezintă o morfologie poroasă în stare umflată, în timp ce particulele cu celule imobilizate (fig. 34 B) prezintă o morfologie mai compactă, celulele fiind puternic ancorate în matricea polimeră, desigur datorită și interacțiilor de natură ionică stabilite cu agentul de reticulare; ele prezintă tendința de a forma aglomerate.

Morfologia acestor particule este și în accord cu comportarea lor la umflare, care evidențiază valori mai coborâte ale gradului maxim de umflare pentru acest tip de particule. Celulele de drojdie sunt relative uniform distribuite în matricea polimeră, și se poate constata că aceasta le acoperă cu un strat subțire (fig. 34 C). Toate rezultatele prezentate anterior probează faptul că particulele de gelan conțin un mare număr de celule, matricea polimeră protejându-le și fixându-le puternic, ceea ce permite să anticipăm că aceste bioreactoare ar putea fi utilizate cu succes în cicluri repetate de fermentare.

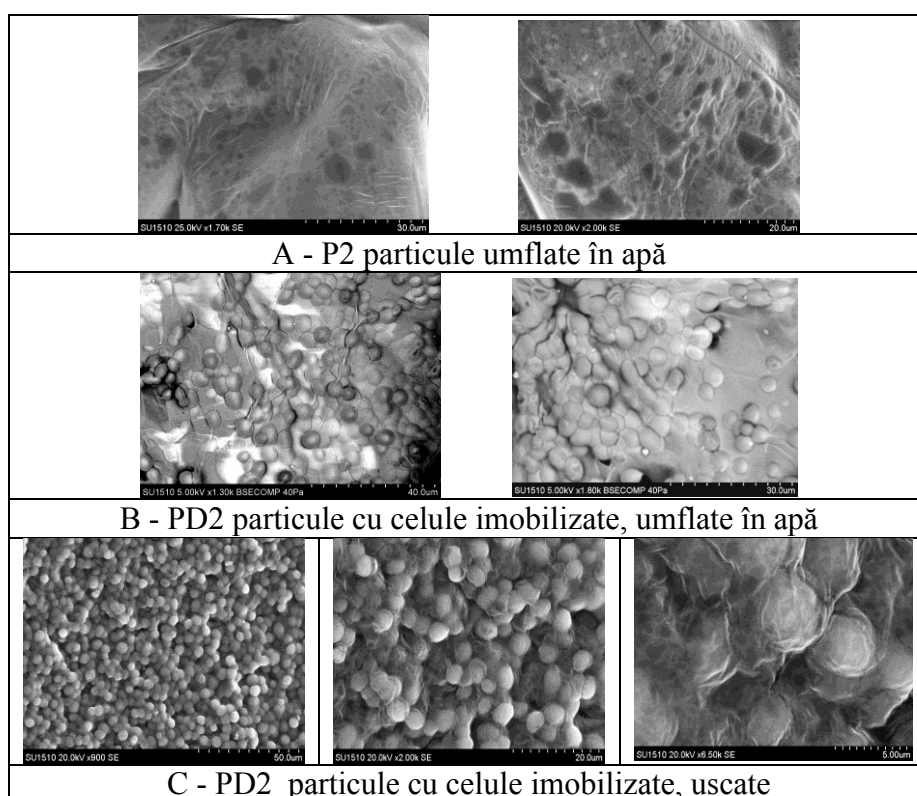


Fig. 34. Fotografii de microscopie electronică de baleiaj pentru particulele de tip P2 și PD2 umflate în apă (A) sau uscate (B).

6.1.5. Activitatea fermentativă a bioreactoarelor

Activitatea fermentativă a microbioreactoarelor obținute a fost testată pentru a determina dacă microbioreactoarele pot fi utilizate în mai multe cicluri fermentative.

Au fost selectate pentru acest studiu două tipuri de imobilizate, caracterizate de grade de reticulare diferite, respectiv PD2 și PD5. Rezultatele obținute sunt prezentate în fig. 35, care ilustrează variația randamentului de transformare a glucozei în timp, pentru 5 cicluri fermentative repetate, la cele două tipuri de bioreactoare, comparativ cu fermentarea în prezența drojdiei libere.

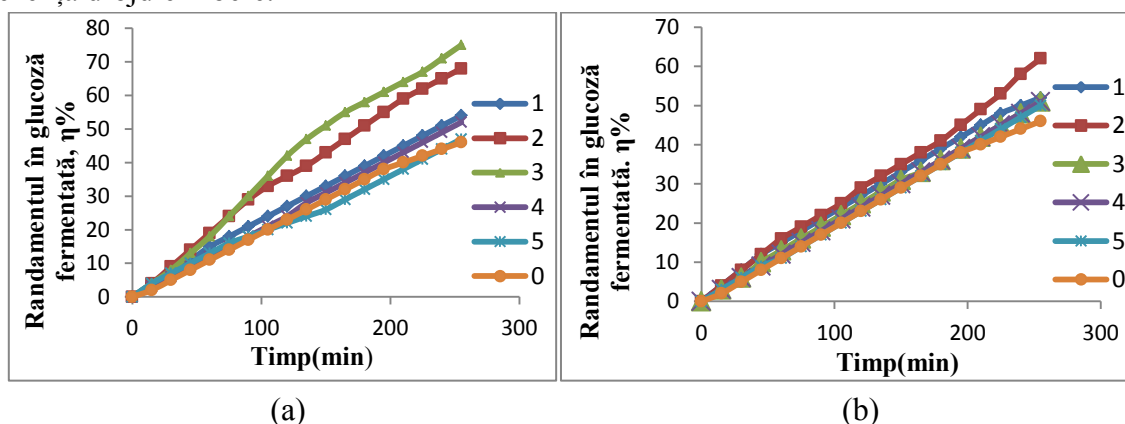


Fig. 35. Variația în timp a randamentului de fermentare a glucozei pentru 5 cicluri, în prezența bioreactoarelor de tip PD2 (a) și PD5 (b) comparativ cu fermentarea în prezența drojdiei libere (curba 0 din diagrame).

Se constată că după 255 minute (durata unui ciclu), randamentul de fermentare obținut cu ambele tipuri de imobilizate este superior celui obținut în prezența drojdiei libere. Un randament superior se obține cu particulele PD2 comparativ cu PD5, pentru toate cele 5 cicluri fermentative (fig. 4 a). Această comportare poate fi pusă pe seama gradului diferit de reticulare al celor două tipuri de particule. Intensitatea difuziei substratului (a soluției de glucoză) este determinată de densitatea rețelei reticulate; difuzie mai intensă și mai rapidă se produce printr-un hidrogel cu grad mai redus de reticulare.

Constatarea cea mai importantă rezultată în urma acestui studiu este aceea că particulele de imobilizat pot fi utilizate în cicluri repetate de fermentare, după separarea facilă prin filtrare și spălarea cu apă bidistilată, în urma fiecărui ciclu realizat. Figura 36 prezintă valoarea randamentelor maxime de fermentare obținute după 10 cicluri fermentative.

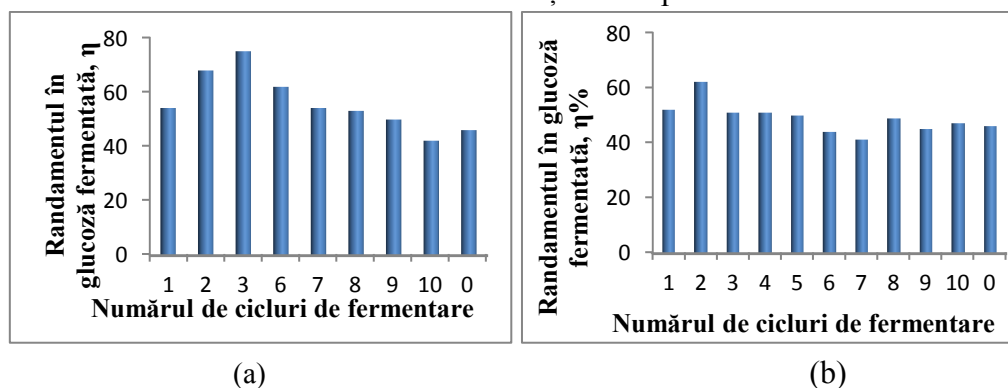


Fig. 36. Valoarea maximă a randamentului de fermentare a glucozei (după 155 min), pentru 10 cicluri repetate, la probele PD2 (a) și PD5 (b).

O observație surprinzătoare este aceea că randamentul obținut cu bioreactoarele de tip PD2 sunt mai mari pentru ciclurile 2 și 3, comparativ cu primul. Același fenomen s-a constatat și pentru ciclul 2 al probei PD5. Explicația poate fi legată de faptul că celulele imobilizate în cele două matrici suferă un proces de multiplicare după primul ciclu de fermentare. Pentru proba PD5 se poate aprecia că randamentul de fermentare rămâne practic constant (cu excepția discutată anterior) pentru cele 10 cicluri probabil datorită gradului mai mare de reticulare ce conferă stabilitate mai mare particulelor; particulele PD2 prezintă însă fluctuații mai mari ale valorii randamentului de fermentare pe parcursul celor 10 cicluri. Randamentele obținute sunt superioare comparativ cu cel realizat în prezența drojdiei libere.

Pentru a stabili dacă particulele sunt stabile în mediul de fermentare după fiecare ciclu de fermentare, a fost determinat, pe baza curbei de calibrare, numărul celulelor de drojdie din mediul de reacție și cantitatea lor. Se constată din datele obținute că numărul de celule care difuzează din particule (în fapt, cantitatea lor) este foarte mic în comparație cu cantitatea de celule care rămân prinse în rețeaua polimeră iar particulele sunt stabile după mai multe cicluri de fermentare repetate.

6.1.6. Evaluarea viabilității celulare și a cantității de celule din particule după fiecare ciclu de fermentare

Păstrarea viabilității celulare în timpul procesului de fermentare este o condiție esențială pentru ca particulele să poată fi utilizate în mai multe cicluri fermentative. În tabelul 16 sunt prezentate valorile viabilității celulare și a numărului/cantității de celule de drojdie rămase în particule.

Tabel 16. Viabilitatea celulară și cantitatea de celule/gram de particule determinate după diferite cicluri de fermentare repetate, pentru proba PD2.

Numărul ciclului de fermentare	Numărul de celule/g particule x 10^8	Cantitatea de celule din particule (mg/g)	Viabilitatea celulară, %
0	4.81	17.81	94.16
1	5.9	21.86	94.9
2	5.97	21.86	95.3
4	6.44	23.71	92.24
8	7.56	27.78	90.16
9	6.4	23.71	90.36
10	5.95	22.04	90.26

Viabilitatea celulară din particule tinde să scadă de la un ciclu la altul. Valorile mari ale viabilității celulare demonstrează că matricea polimeră protejează celulele de drojdie de factorii care pot să afecteze creșterea celulară. Există o bună concordanță între cantitatea de celule din particule și evoluția randamentului în fermentare (fig. 37). După ciclul 6 de fermentare randamentul începe să scadă, la fel ca și cantitatea de celule din particule.

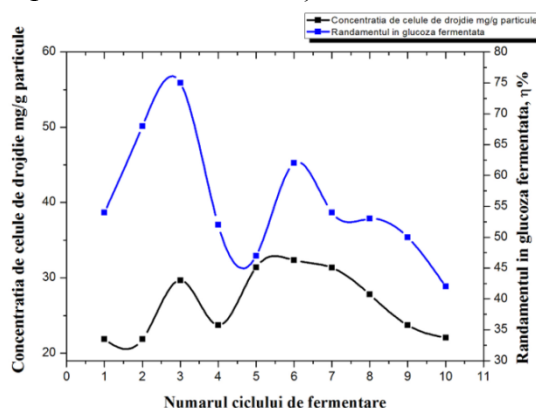


Fig. 37. Evoluția cantității de celule (mg)/g particule în funcție de numărul ciclului de fermentare pentru proba PD2 în corelare cu randamentul maxim obținut după fiecare ciclu de fermentare.

Rezultatele obținute demonstrează, de asemenea, că gradul de reticulare al particulelor este optim asigurând o porozitate adecvată, necesară pentru un schimb eficient de nutrienți între mediul de fermentare și celulele din interiorul particulelor. Randamentele în fermentare obținute sunt optime, comparabile cu cele obținute la fermentarea cu drojdia liberă, iar particulele pot fi cu ușurință recuperate din fermentator și reutilizate în mai multe cicluri fermentative.

6.1.7. Productivitatea specifică și viteza de fermentare

Curbele cinetice de fermentare au o alură practic liniară, ceea ce permite cu ușurință estimarea vitezei procesului, exprimată ca procent de glucoză transformată în unitatea de timp. Pe baza lor se poate evalua, de asemenea, productivitatea specifică în etanol (g etanol/g drojdie x h, din particulele de imobilizat).

Tabel 17. Valorile vitezei de fermentare și ale productivității specifice în etanol pentru imobilizatele PD2 and PD3, pentru cele 10 cicluri de fermentare.

Numărul ciclului de fermentare	Viteza de fermentare (% glucose transformată /min)		Productivitatea specifică în etanol (g etanol / h .g drojdie)	
	PD2	PD3	PD2	PD3
1	0.24	0.27	0.6	0.6
2	0.31	0.27	0.97	0.8
3	0.29	0.22	1.07	0.6
4	0.2	0.2	0.6	0.6
5	0.22	0.2	0.6	0.6
6	0.27	0.2	0.83	0.6
7	0.24	0.2	0.6	0.6
8	0.22	0.16	0.6	0.6
9	0.18	0.16	0.6	0.5
10	0.2	0.2	0.6	0.6
Drojdie liberă	0.07		0.6	

Valorile acestor caracteristici sunt prezentate în tabelul 17. Este interesant faptul că valorile productivității specifice sunt practic aceleași pentru cele mai multe dintre ciclurile de fermentare, și sunt comparabile sau chiar superioare celei corespunzătoare fermentării în prezența celulelor de drojdie libere.

6.2. Particule pe bază de gelan reticulat cu acetat de magneziu conținând celule de drojdie imobilizate

Cercetarea de față are ca scop obținerea de particule sferice cu caracter de hidrogel conținând celule de drojdie, pe bază de gelan reticulat ionic – gelifiere ionotropă -, printr-un proces de extrudare, utilizând ca agent de reticulare acetatul de magneziu. Particulele obținute sunt caracterizate fizico-chimic și morfologic, din punct de vedere al stabilității structurale, al activității biocatalitice. Avantajele utilizării magneziului pentru creșterea celulară și în procese fermentative sunt multiple. Ionul de magneziu este un ionul metalic cel mai abundent implicat într-o gamă largă de procese metabolice [29, 30]. El constituie cam 0.3% din întreaga cantitate de drojdie uscată și activează peste 300 de enzime [22, 33, 48].

Realizarea imobilizatorilor de drojdie în matricea de gelan are la bază fixarea celulelor de drojdie în ochiurile rețelei formate prin reticularea polizaharidului, ca urmare a legării ionice a cationilor de magneziu la anionii carboxilat ai gelanului.

Majoritatea particulelor au fost obținute prin extrudare în capilară (ac de seringă) cu diametrul interior de 600 microni și lungimea de 30 mm. Particulele obținute sunt sferice și au dimensiuni cuprinse între 2.5 și 3.7 mm în funcție de valoarea parametrilor procesului și de caracteristicile capilarei.

Creșterea concentrației soluției de polimer determină creșterea ușoară a diametrului sferelor (probele P1-P3). Efectul cel mai pronunțat îl produce concentrația soluției de reticulant în preextrudat (probele P4 – P7; P11; P13), când diametrul scade de la 3,3 la 2,5 mm.

Tabelul 18. Tipuri de particule de gelan obținute prin gelifiere ionotropa: parametrii procesului de obținere prin extrudare și diametrul lor mediu.

Proba	Caracteristicile capilarei (diametru x lungime) (mm/mm)	Concentrația Soluției de gelan (g/100 ml)	Concentrația soluției de $\text{Mg}(\text{OCOCH}_3)_2$ n preextrudat (g/100 ml)	Concentrația soluției de $\text{Mg}(\text{OCOCH}_3)_2$ în baia de extrudare (g/100 ml)	Diametrul mediu al particulei (mm)
P1	0.6 x 30	0.8	0.4	2	2.5
P2	0.6 x 30	1.15	0.4	2	2.6
P3	0.6 x 30	1.3	0.4	2	3.0
P4	0.6 x 30	1	0.2	2	3.3
P5	0.6 x 30	1	0.4	2	2.8
P6	0.6 x 30	1	0.6	2	2.7
P7	0.6 x 30	1	0.8	2	2.5
P8	0.6 x 30	1	0.4	1	3.1
P9	0.6 x 30	1	0.4	3	2.6
P10	0.6 x 30	1	0.4	4	2.5
P11	0.8 x 40	1	0.4	1	3.7
P12	0.8 x 40	1	0.4	2	3.0
P13	0.8 x 40	1	0.8	2	2.6

Cantitatea de reticulant din baia de extrudare contribuie la reticularea suplimentară a gelanului din particulă, dar mai ales la suprafața acesteia, careia îi conferă stabilitate mecanică; diametrul particulei scade cu creșterea concentrației reticulantului în baia de extrudare (probele P8, P5, P9, P10; P11-P12). Pentru caracterizarea ulterioară a particulelor, au fost luate în considerare doar cele obținute prin extrudare prin capilara cu caracteristicile diametru/lungime = 0.6/30 (mm/mm).

6.2.1. Morfologia particulelor

S-a constatat o influență evidentă a cantității de reticulant utilizat asupra morfologiei particulelor. Pentru ilustrare (fig. 40) s-au reținut probele P9 și P10, care diferă prin cantitatea de reticulant utilizat în baia de coagulare. Este evident din analiza fotografiilor, indiferent de rezoluție, că proba P10 are o structură mai compactă, determinată de utilizarea unei cantități mai mari de reticulant. Figurile relevă, de asemenea, prezența matricii de gelan reticulat care ancorează celulele de drojdie, cu caracter mai poros în cazul probei P9. Se observă că celulele se găsesc în număr mare în particule și sunt bine ancorate în rețeaua polimeră.

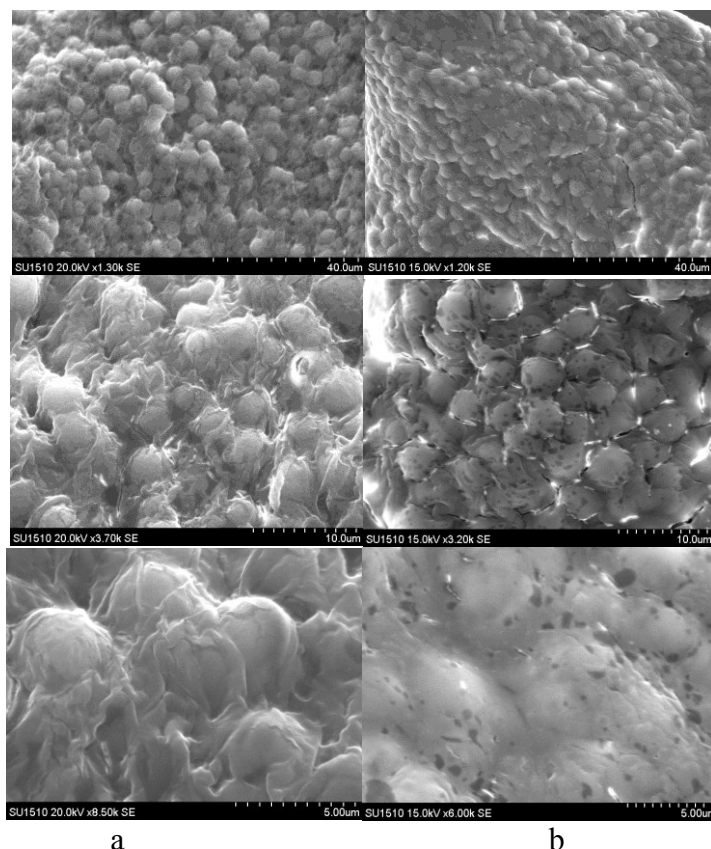


Fig. 40. Fotografii de microscopie electronică de baleiaj ale particulelor P9 (a) și P10 (b) (trei rezoluții)

6.2.2. Stabilitatea în apă și viabilitatea celulară

Pentru a aprecia stabilitatea particulelor obținute determinată de o structurare mai mult sau mai puțin puternică a lor, s-a considerat utilă și semnificativă, în primul rând determinarea turbidității (transmitanței) mediilor apoase în care acestea sunt obținute, respectiv păstrate. Valorile transmitanței scad ușor în timp atât în soluția de reticulare cât și în apă bidistilată dar se păstrează ridicate ceea ce atestă faptul că particulele sunt stabile în timp atât în soluția de extrudare cât și în apă bidistilată; câteva rezultate sunt prezentate în tabelul 19.

Valorile cele mai mari ale transmitanței se înregistrează la particulele mai reticulate, respectiv cele cu o concentrație mai mare de reticulant fie în preextrudat (P2) fie în baia de extrudare (P10). Valorile transmitanței sunt mai reduse la particulele cu drojdie încapsulată (PiD) în comparație cu cele înregistrate la particulele obținute în aceleași condiții fără drojdie, dar totuși sunt destul de ridicate, ceea ce conduce la concluzia că celule de drojdie au fost imobilizate eficient în rețeaua polimeră (Tabelul 20).

Tabel.19. Valorile transmitanței soluției de extrudare, respectiv a apei bidistilate în care s-au păstrat câteva dintre particulele obținute

Proba	Concentrația soluției de gelan (g/100 ml)	Concentrația soluției de $Mg(OCOCH_3)_2$ în preextrudat (g/100 ml)	Concentrația soluției de $Mg(OCOCH_3)_2$ în baia de extrudare (g/100 ml)	Transmitanța T (%)				
				în soluția de extrudare		în apă bidistilată		
				30 min.	12 h.	3 h.	12h.	24 h.
P4	1	0.2	2	99.6	98.8	98.5	97.0	95.6
P5	1	0.4	2	99.8	99.0	99.0	98.2	96.7
P9	1	0.4	3	99.2	99.1	99.1	99.0	97.9
P10	1	0.4	4	99.8	99.3	99.1	99.0	98.2

Tabel 20. Valorile transmitanței soluției de extrudare, respectiv a apei bidistilate în care s-au păstrat câteva dintre particulele obținute conținând drojdie încapsulată, în corelare cu concentrația celulelor în cele două medii și cu viabilitatea celulară

Proba	Transmitanța, T%					Concentrația celulelor de drojdie/ml x 10 ⁴ în supernatant			Viabilitatea celulară, %		
	În soluție de agent de reticulare		în apă bidistilată			În soluție de agent de reticulare		în apă bidistilată	În soluție de agent de reticulare		în apă bidistilată
	4h	12h	4h	12h	24h	12h	12h	24h	12h	12h	24h
P4D	93.7	86.5	94	85.3	86.4	16.5	38	58.5	96	95.73	94.15
P5D	96.3	94.8	96.8	90.2	88	10.75	11	23.5	93	93.18	93.49
P9D	97.7	96.4	97.4	96.4	95	6.25	9.25	18.5	92	89.19	88.24
P10D	99.8	98.8	98.3	96.7	95.5	2.50	6	14.5	90	88.07	87.93

Deși numărul de celule care părăsesc matricea polimeră scade cu creșterea gradului de reticulare, numărul de celule moarte din totalul de celule libere crește ușor (viabilitatea celulară scade, atât în supernatantul de la extrudare cât și în apa distilată dar se păstrează la valori ridicate de peste 87%). Valorile mari ale transmitanței și numărul relativ mic de celule care difuzează din supernatant ne determină să afirmăm că particulele sunt stabile în medii apoase și ar putea fi utilizate în procese fermentative repetate.

6.2.3. Stabilitatea în soluții alcoolice și viabilitatea celulară

Câteva tipuri de particule au fost analizate din punct de vedere al stabilității într-o soluție alcoolică de 100g/l, această proprietate fiind evaluată, ca și în cazul anterior, prin monitorizarea transmitanței mediului alcoolic în care au fost suspendate sferele de gelan cu drojdie încapsulată, la diferite durate (între 12 și 84 ore). Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 21.

Se constată că matricea polimeră protejează celulele de drojdie imobilizate de metaboliții toxici din etanol și le păstrează viabilitatea celulară mai mult timp, la valori ridicate.

Tabel 21. Valorile transmitanței soluției alcoolice (100 g/l), în care au fost suspendate câteva dintre particulele obținute, conținând drojdie încapsulată

Proba	Transmitanța în alcool T%				Concentrația celulelor de drojdie/ml x 10 ⁴				Viabilitatea celulară, %			
	12h	36h	60 h	84h	12h	36h	60h	84h	12h	36h	60 h	84h
P5D	99.2	98.3	98	97.6	3	3.5	4.5	5.5	100	93	90	88
P9D	99.4	99.1	98.3	97.8	2.8	3.5	4	5.3	100	93	94.11	91.3
P10D	99.7	99.4	99	98.1	2	2.5	3.5	4	100	91	93.33	88.9

6.2.4. Caracteristicile de umflare în apă

Sferele de gelan obținute prin gelifiere ionotropă prezintă un evident caracter de hidrogel, astfel încât caracteristicile lor de umflare în apă sunt importante atât pentru stabilitatea lor, cât și pentru utilizarea ulterioară în fermentare, unde se impune ca substratul (glucoza) să poată difuza la celulele de drojdie prinse în rețeaua polimeră. S-au utilizat pentru această determinare doar o parte din probe (P4, P5, P9, P10), respectiv cele mai stabile și cu diferite concentrații fie în preextrudat, fie în baia de extrudare. Gradul de umflare a fost determinat în două variante: variația în timp a gradului de umflare determinat prin uscarea treptată a particulelor la temperatură constantă, este reprezentată în fig. 41.

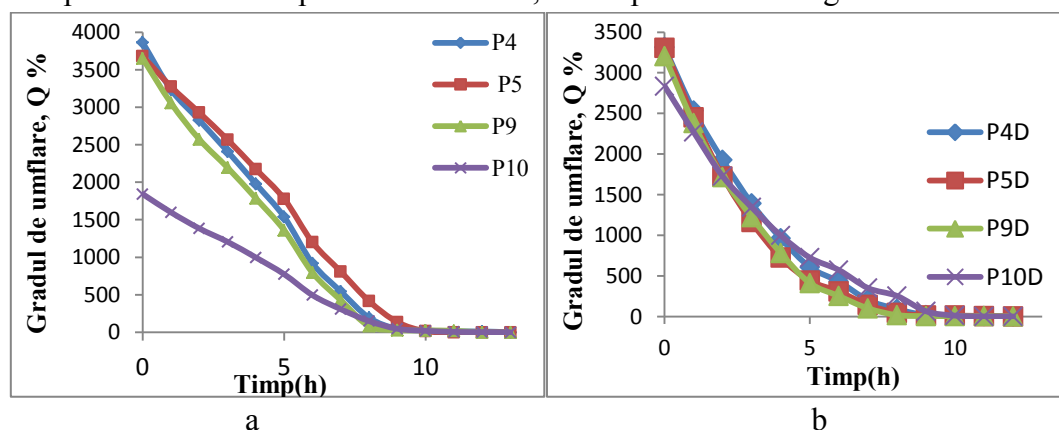


Fig.41. Variația în timp a gradului de umflare în condițiile uscării unor particule până la greutate constantă. a – particule fără drojdie; b – particule cu drojdie.

Se constată că proba cea mai reticulată (P10) prezintă valorile cele mai coborâte ale gradului de umflare, efectul fiind determinat de gradul lor mai ridicat de reticulare. Evoluții apropiate ale acestei proprietăți prezintă celelalte trei tipuri de particule (Fig.41 a). La un grad de reticulare identic, particulele încărcate cu drojdie prezintă valori mai coborâte ale gradului de umflare, efect care sprijină, indirect, ipoteza că între grupele funcționale ale polimerului și cele ale proteinei din compoziția drojdiei se manifestă interacții puternice, la care se adaugă cele dintre ioni de Mg^{2+} și celulă având drept consecință creșterea densității rețelei polimere (Fig.41 b). Determinarea gradului de umflare prin suspendarea particulelor inițial uscate perfect, în apă distilată și cântărirea lor după diferite perioade de timp, a condus la rezultate diferite. Se constată că procesul de pierdere, respectiv reținere de apă nu sunt reversibile.

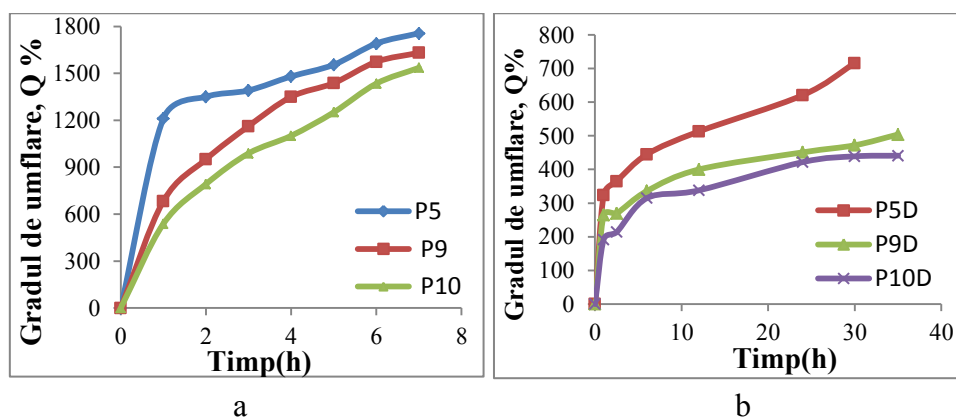


Figura 42. Variația în timp a gradului de umflare în condițiile umflării unor particule ce nu conțin drojdie (a) și la cele care conțin celule de drojdie (b) până la greutate constantă.

La un grad de reticulare identic, particulele încărcate cu drojdie prezintă valori mai coborâte ale gradului de umflare în comparație cu cele care nu conțin drojdie, prin posibila participare a biocatalizatorului la reticularea polizharidului.

6.2.5. Stabilitatea mecanică a particulelor evaluată prin teste reologice

Pentru studiu au fost alese două probe, care diferă prin gradul de reticulare conferit de cantitățile diferite de reticulant utilizat, considerând că ele pot oferi concluzii ce pot fi generalizate apoi la celelalte probe. Acestea sunt P5 și P10, cu și fără drojdie (D).

Un prim set de teste l-a constituit baleiajul de amplitudine, cu ajutorul căruia s-au determinat limitele domeniului vâscoelastic liniar ca fiind 0.1% pentru probele P5 și P5D și 0.05% pentru probele P10 și P10D (figura 43).

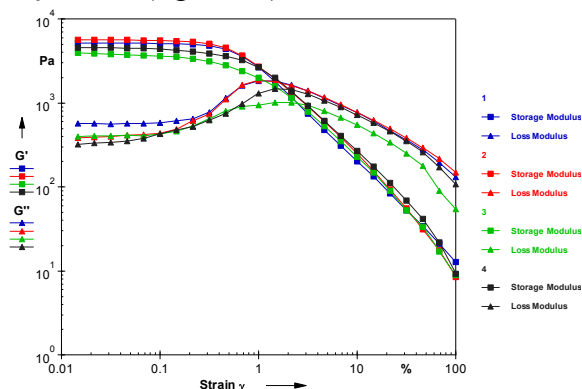


Fig.43. Rezultatele testului de baleiaj în amplitudine pentru probele P5 și P5D respectiv pentru probele P10 și P10D

Al doilea set de teste, realizat pentru aceleași probe, l-a constituit baleiajul de frecvență, ale cărui rezultate sunt prezentate în figura 44.

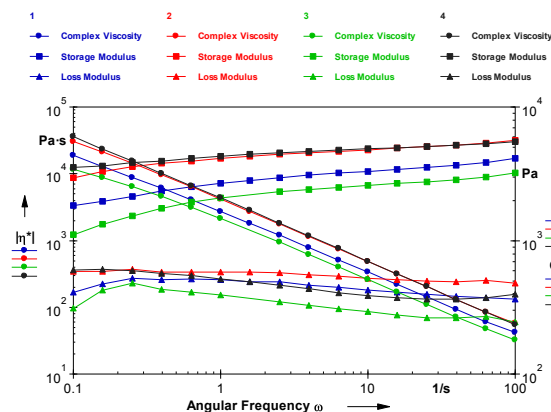


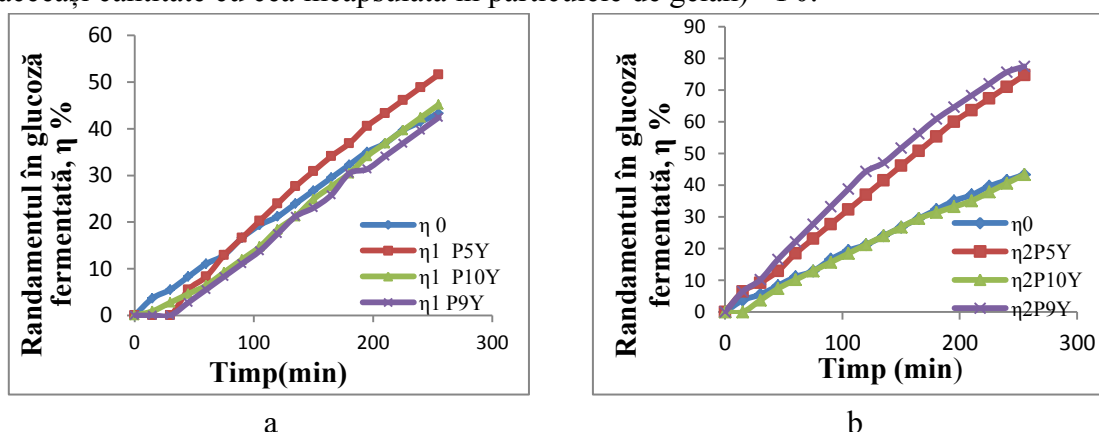
Fig.44. Rezultatele testului de baleiaj în frecvență pentru probele P5 și P5D, respectiv P10 și P10D

Se constată că valorile modulului G' pentru cele două probe sunt apropiate, semnificând faptul că stabilitatea și rezistența structurală ale probelor sunt apropiate, în concordanță și cu valorile transmitanței soluțiilor din supernatant. Proba cu un grad mai mare de reticulare (concentrația în baia de extrudare de 4 % față de 2% din cealaltă probă) prezintă o stabilitate ușor superioară. Testele reologice au permis, totodată, evidențierea faptului că stabilitatea particulelor încărcate cu drojdie este mai ridicată decât a celor neîncărcate, păstrându-se totodata mai ridicată la particulele mai reticulate. Și în acest caz există o corelație rezultatele anterioare privind comportarea la umflare a particulelor este deplină, întărind concluzia că însuși drojdia contribuie la ranforsarea structurii rețelei.

6.2.6. Testarea activității fermentative a imobilizatorilor

Au fost realizate fermentări cu toate tipurile de imobilizate, constatându-se obținerea de randamente ridicate, comparabile cu cele realizate cu drojdia liberă. Dintre acestea au fost selectate trei tipuri de particule (P5, P9, P10), utilizate într-un număr mare de cicluri repetate.

În fig. 45 au fost reprezentate curbele primelor 4 cicluri de fermentare. Pentru comparație, pe fiecare figură este prezentată și curba de fermentare în prezența drojdiei libere (aceeași cantitate cu cea încapsulată în particulele de gelan) - P0.



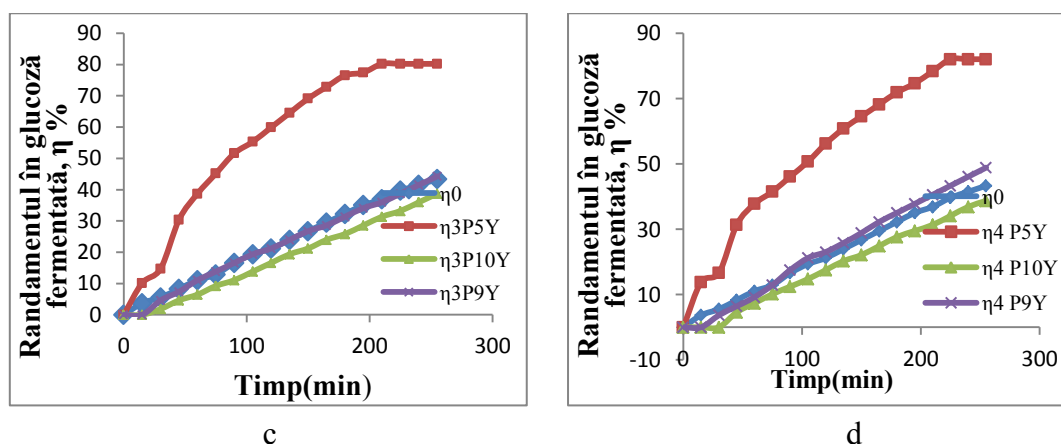


Fig.45. Curbe de fermentare realizate de particulele de tip P5, P9 si P10 în cicluri de fermentare diferite: a - ciclul 1; b – ciclul 2; c – ciclul 3; d – ciclul 4.

Se constată că cele mai ridicate randamente în fermentare se ating cu particulele P5, caracterizate de un grad mai redus de reticulare (cu excepția ciclului 2, mai eficace pentru proba 9). Explicația constă în densitatea de reticulare mai mică a rețelei de hidrogel, care facilitează difuzia moleculelor voluminoase de substrat (glucoza) la celule de drojdie. În sprijinul acestei explicații vin și rezultatele fermentării în prezența probei P10, randamentele fiind în acest caz cele mai coborâte, evident datorită gradului de reticulare cel mai ridicat al acesteia, în corelare și cu curbele de umflare (fig. 41, 42).

Pentru studii mai aprofundate, a fost reținută proba P5, figura 46 prezentând curbe de fermentare pentru primele 5 cicluri, comparativ cu o cantitate de drojdie liberă echivalentă celei imobilizată în matricile sferice de gelan.

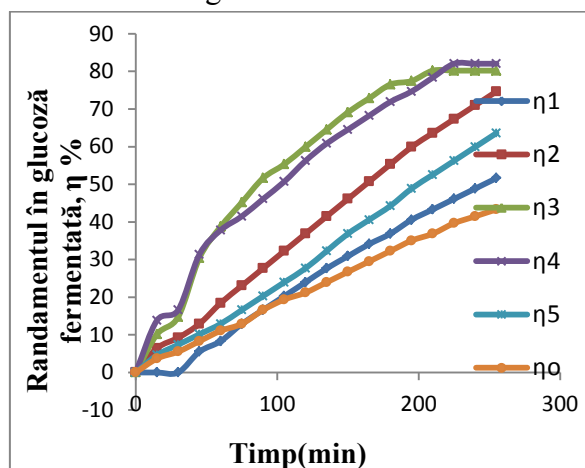


Fig.46. Variația în timp a randamentului de fermentare a glucozei în prezența imobilizatului P5, în 5 cicluri de fermentare succesive, comparativ cu drojdia liberă.

Valorile ridicate ale randamentului atinse chiar după 5 cicluri, au determinat utilizarea în continuare a imobilizatului până la 20 de cicluri, intervalul de timp între cicluri fiind de 15 min. În figura 47 este ilustrat randamentul maxim de fermentare a glucozei, selectiv, pentru câteva dintre cele 20 de cicluri. Trebuie precizat că randamentul de fermentare, indiferent de ciclul la care se face referire, este superior celui atins în prezența drojdiei libere, fapt confirmat și de alte rezultate raportate în literatură [332].

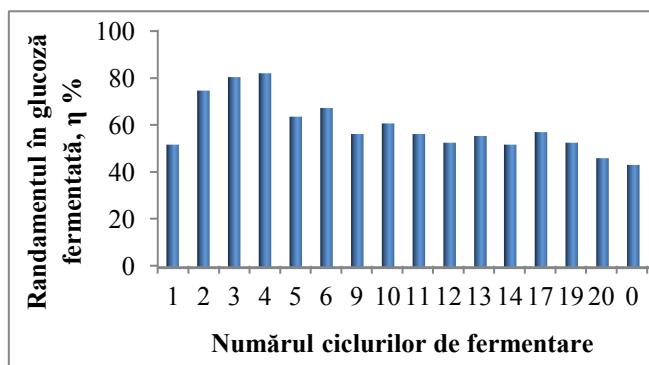


Fig. 47. Randamentul maxim de fermentare a glucozei în prezența drojdiei libere (0), respectiv a drojdiei imobilizate în particulele de tip P5D, pentru câteva dintre cele 20 de cicluri de fermentare (interval de 15 min între cicluri)

O creștere însemnată randamentului se înregistrează între ciclurile 2-4. O explicație posibilă ar fi faptul că după primul ciclu se produce o umflare mai accentuată a particulelor, care facilitează difuzia substratului la celulele imobilizate. După ciclul 6 de fermentare, valoarea randamentului maxim scade ușor, păstrându-se la valori relativ constante până la ciclul 20. Scăderea treptată a randamentului în următoarele cicluri poate fi datorată, în principiu, reducerii numărului de celule de drojdie din matricea sferică de gelan.

Se constată că după fiecare ciclu de fermentare, din matricea de gelan difuzează o cantitate de celule foarte redusă însă comparativ cu cea imobilizată ($6,323 \times 10^{-3}$ g). Rezultatele obținute demonstrează că particulele testate în procese fermentative repetate sunt stabile.

Trebuie remarcat și faptul că numărul de cicluri de fermentare ce poate fi realizat cu particulele de imobilizat scade pentru cele trei tipuri de particule în funcție de gradul lor de reticulare, de la 20 (proba P5) la 9 (proba P9), respectiv 6 (proba P10).

Rezultatele foarte bune obținute cu particulele de tip P5, au încurajat încercarea de a realiza un număr cât mai mare de cicluri de fermentare. S-au realizat astfel un număr de 40 de cicluri (4 ore intervalul de timp dintre cicluri). În fig. 48 este prezentată doar valoarea randamentului de fermentare atins după 255 minute, pentru câteva cicluri considerate aleator.

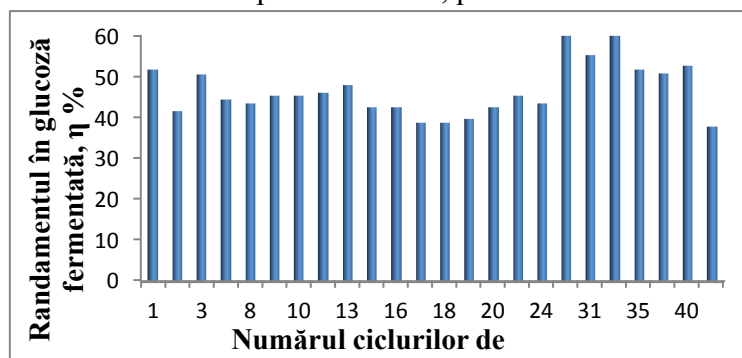


Fig. 48. Valoarea randamentului de fermentare a glucozei atins după 255 minute, în cazul utilizării succesive a imobilizantului P5, comparativ cu drojdia liberă

Se constată că în toate cazurile se obțin randamente superioare celui realizat în prezența unei cantități de drojdie liberă, echivalentă cu cea din imobilizat.

Tabelul 23, prezintă numărul, cantitatea și viabilitatea celulelor de drojdie din imobilizatele realizate în prezența magneziului, după fiecare ciclu de fermentare, pe durata a 10 cicluri.

Tabel 23. Numărul, cantitatea și viabilitatea celulară a drojdiei de bere din imobilizate de gelan reticulat cu ioni de Mg^{2+} determinate după fiecare din cele 10 cicluri de fermentare

Numărul ciclului de fermentare	Numărul de celule/g particule x 10 ⁸	Cantitatea de celule/g particule, mg	Viabilitatea celulară, %
0	6.36	23.56	94.98
1	7.04	26.08	93.72
2	6.09	22.56	93.91
3	6.45	23.9	
4	7.22	26.75	94.23
5	6.65	24.64	
6	6.14	22.75	
7	7.35	27.23	
8	7.06	26.89	88.94
9	6.29	23.3	91.66
10	7.08	26.23	

Este evident din rezultatele prezentate rolul protector al matricii față de celulele de drojdie imobilizate, ceea ce permite proliferarea lor în rețeaua polimeră, menținându-le într-un număr ridicat ce favorizează obținerea de randamente mari, permanent superioare celui obținut cu drojdia liberă

6.3. Particule pe bază de gelan reticulat cu acetat de zinc conținând celule de drojdie imobilizate

Zincul este un element foarte important în procesele fermentative deoarece are rol de activator enzimatic al alcool dehidrogenazei. Un mediu deficient în zinc poate duce la încetinirea sau la o fermentare incompletă iar această problemă a fost semnalată în industria berii [51]. Prezentul subcapitol raportează rezultatele obținute în realizarea particulelor de gelan cu celule de drojdie imobilizate reticulate ionic, prin metoda extruderii, în prezența ionilor de Zn^{2+} . Particulele obținute au fost caracterizate din punct de vedere morfologic, fizico-chimic iar activitatea lor fermentativă a fost testată și comparată cu activitatea fermentativă a drojdiei libere. Celulele de drojdie sunt prinse în ochiurile rețelei formată prin reticulare ionică. Caracterul de metal tranzițional al zincului metal determină și reacții de complexare, ceea ce conduce la formarea unei rețele de gel mai puternice comparativ cu utilizarea altor metale divalente din grupa a IIA principală.

Comparativ cu reticularea cu ioni de Ca^{2+} , respectiv de Mg^{2+} , pentru ionii de Zn^{2+} s-a lucrat cu concentrații de acetat cu un ordin de mărime mai mic.

Tabel 24. Programul experimental pentru obținerea particulelor de gelan reticulat cu Zn^{2+} fără și cu celule de drojdie

Proba	Concentrația de gelan (%)	Concentrația de acetat de zinc în preextrudat* (%)	Concentrația de acetat de zinc în baia de reticulare** (%)
A2	0.1	0.02	0.1
A3		0.04	
A4		0.06	
A5		0.08	
L2	0.1	0.02	0.08
L3		0.04	
L4		0.06	
L5		0.08	
N2	0.1	0.02	0.05
N3		0.04	
N4		0.06	
N5		0.08	

*volumul soluției: 1.25 ml ; **volumul soluției: 125 ml

Același program experimental s-a utilizat pentru obținerea particulelor cu celule de drojdie imobilizate, codul probelor conținând în plus litera D.

6.3.1. Stabilitatea particulelor și viabilitatea celulară

Stabilitatea în apă a particulelor cu și fără celule de drojdie imobilizată s-a evaluat ca și în cazurile anterioare, prin determinarea turbidității (transmitanței) soluției în care particulele sunt suspendate diferite perioade de timp. În tabelul 25 și 26 sunt prezentate rezultatele obținute la determinarea transmitanței iar în tabelul 26 sunt prezentate și concentrația de celule care difuzează din particule și viabilitatea celulară

Datorită legăturilor coordinative foarte stabile create de ionul de zinc, particulele de gelan cu și fără celule de drojdie imobilizate prezintă o stabilitate structurală ridicată, care crește, în general, cu creșterea gradului de reticulare.

Concentrația de celule din baia de reticulare măsurată la diferite intervale de timp este mai mare decât concentrația de celule de drojdie ce se găsește la păstrarea particulelor în apă bidistilată. O ipoteză ar fi aceea că o parte din celulele de drojdie care nu au fost prinse în rețea (datorită densității mari a acesteia) se regăsesc în soluția de extrudare.

Rezultatele arată că particulele de gelan reticulate cu acetat de zinc ajută la păstrarea viabilității celulare în timp iar particulele cu celule de drojdie imobilizate ar putea fi utilizate în procese fermentative în cicluri repetate de fermentare

Tabel 25. Valorile transmitanței pentru particule fără celule de drojdie imobilizate, determinate după diferite perioade de păstrare în medii apoase.

Proba	Transmitanța, T %				
	În soluția din baia de extrudare		În apă bidistilată		
	12 h	24 h	12 h	24 h	48 h
A2	99	98.8	99.4	99.2	99
A3	99.6	99.3	99.6	99.3	99.1
A4	99.4	99.2	99.7	99.4	99.1
A5	99.6	99.4	99.7	99.6	98.7
L2	99.2	98.6	99.4	99.1	98.5
L3	99.3	98.8	99.4	99.2	98.9
L4	99.4	99.1	99.6	99.3	99
L5	99.5	99.2	99.7	99.4	99.2
N2	99.1	98.2	99.2	98.9	97.1
N3	99.4	98.3	99.3	98.9	97.4
N4	99.5	98.4	99.9	99	97.7
N5	99.2	98.8	99.2	98.8	97.9

Tabel 26. Valorile transmitanței și a viabilității celulare la câteva probe păstrate în diferite medii

Proba	Transmitanța, T%				Concentrația celulelor x 10 ⁴ în supernatant				Viabilitatea celulară, %			
	În soluția de acetat de zinc		În apă bidistilată		În soluția de acetat de zinc		În apă distilată		În soluția de acetat de zinc		În apă distilată	
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
A2D	98.9	98.1	98.9	97.9	7	10	2.75	5.5	100	95.24	84.62	88
A4D	98.1	97.7	97.5	97.2	16	10.25	9.25	18	96.96	95.34	92.5	92.3
A5D	98.8	97.9	98.9	97.5	2	10	2.75	5	98.88	97.56	91.66	86.95
L2D	98.5	97.9	98.7	97.4	7.25	11.25	3.5	6.25	100	95.74	87.5	89.2
L4D	98.6	96.9	97.6	97.4	7.25	9.25	3	4.5	93.54	92.5	92.3	85.71
L5D	97.6	97.5	98.4	97.8	5.25	6.25	2.5	5	91.3	89.28	83.33	83.3
N2D	98.4	97	98.6	96.5	8.5	12.5	4.75	8	100	92.59	95	91.43
N4D	97.4	97.1	98.2	96.8	7.5	9.25	3	5.25	90.9	90.2	92.3	91.3
N5D	98.2	97.9	99	97.5	5	6.25	2.5	4.75	90.9	89.2	83.33	82.6

6.3.2. Stabilitatea mecanică a particulelor

Pentru utilizarea particulelor în cicluri repetate de fermentare stabilitatea lor structurală este foarte importantă, astfel încât evaluarea sa prin teste reologice devine necesară, chiar dacă este o metodă indirectă. Au fost alese pentru analiză 6 probe obținute la aceeași concentrație de acetat de zinc în preextrudat (0.06%), aceeași concentrație în polimer (1%) dar cu concentrații diferite în baia de reticulare. Probele alese pentru testare au fost particule cu și fără celule de drojdie imobilizate.

Un prim set de teste l-a constituit baleiajul de amplitudine (cu ajutorul căruia s-au determinat limitele domeniului vâscoelastic liniar (figura 50).

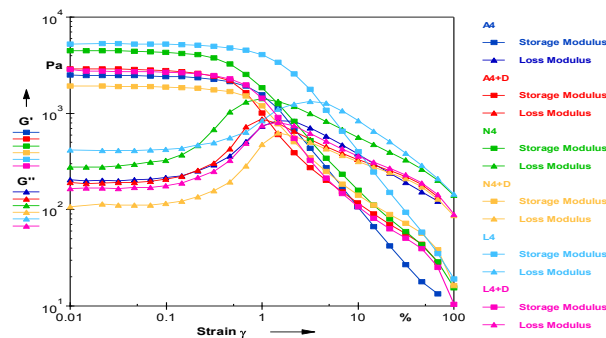


Fig.50: Baleiaj de amplitudine pentru probele A4 și A4D, L4 și L4D respectiv N4 și N4D
 $T = 30^{\circ}\text{C}$, deformația $\gamma = 0.01 \div 100\%$, frecvența unghiulară constantă, $\omega = 10 \text{ rad/s}$

Al doilea set de teste, realizat pentru aceleași probe, l-a constituit baleiajul de frecvență, ale cărui rezultate sunt prezentate în Figura 51.

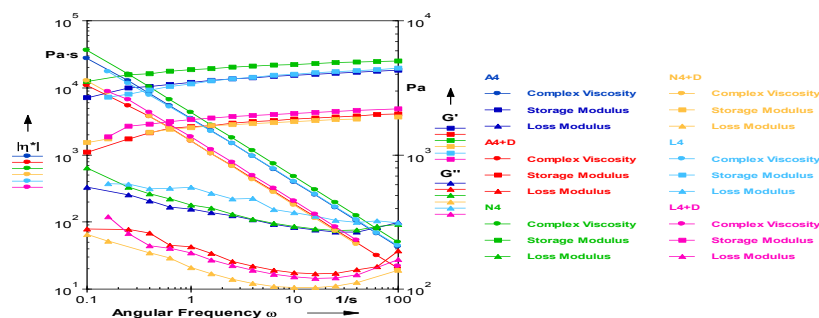


Fig. 51. Baleiaj de frecvență (FS – frequency sweep) pentru probele A4 și A4D, L4 și L4D respectiv N4 și N4D ($T = 30^{\circ}\text{C}$, deformația constantă în domeniul liniar viscoelastic, frecvența unghiulară $\omega = 0.1 \div 100 \text{ rad/s}$)

Se constată în cazul probelor analizate că stabilitatea lor mecanică crește cu creșterea densității de reticulare. Valorile modulului G' pentru probele analizate sunt apropiate semnificând faptul că stabilitatea și rezistența structurală ale probelor (“rigiditatea”) sunt apropiate, în concordanță și cu valorile transmitanței soluțiilor de supernatant.

6.3.3. Gradul de umflare

Comportamentul în apă al particulelor sferice de gelan, cu și fără celule de drojdie, s-a evaluat prin gradul de umflare ($Q\%$). S-au utilizat pentru această determinare doar o parte din probe (A2, L2 și N2), respectiv cele mai stabile obținute la diferite concentrații de acetat de zinc în baia de extrudare, cea din preextrudat fiind aceeași pentru toate probele analizate.

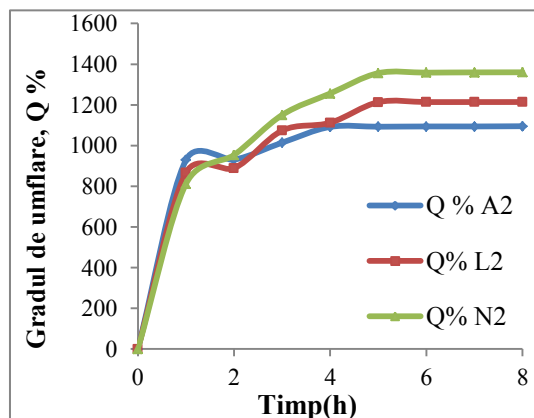


Fig. 52. Variația în timp a gradului de umflare pentru probele A2, L2 și N2.

Rezultatele obținute demonstrează că particulele au un puternic caracter de hidrogel, ele putând absorbi cantități mari de apă. Gradul de umflare depinde de gradul de reticulare al particulelor. Cu cât densitatea de reticulare este mai mare cu atât valoarea gradului de umflare scade. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu rezultatele obținute la testele reologice și la testarea stabilității particulelor în medii apoase prin măsurarea transmitanței.

6.3.4. Morfologia particulelor

În fig. 53 sunt prezentate fotografiile realizate prin microscopie electronică de baleiaj pentru cele două probe analizate (A2D, L2D).

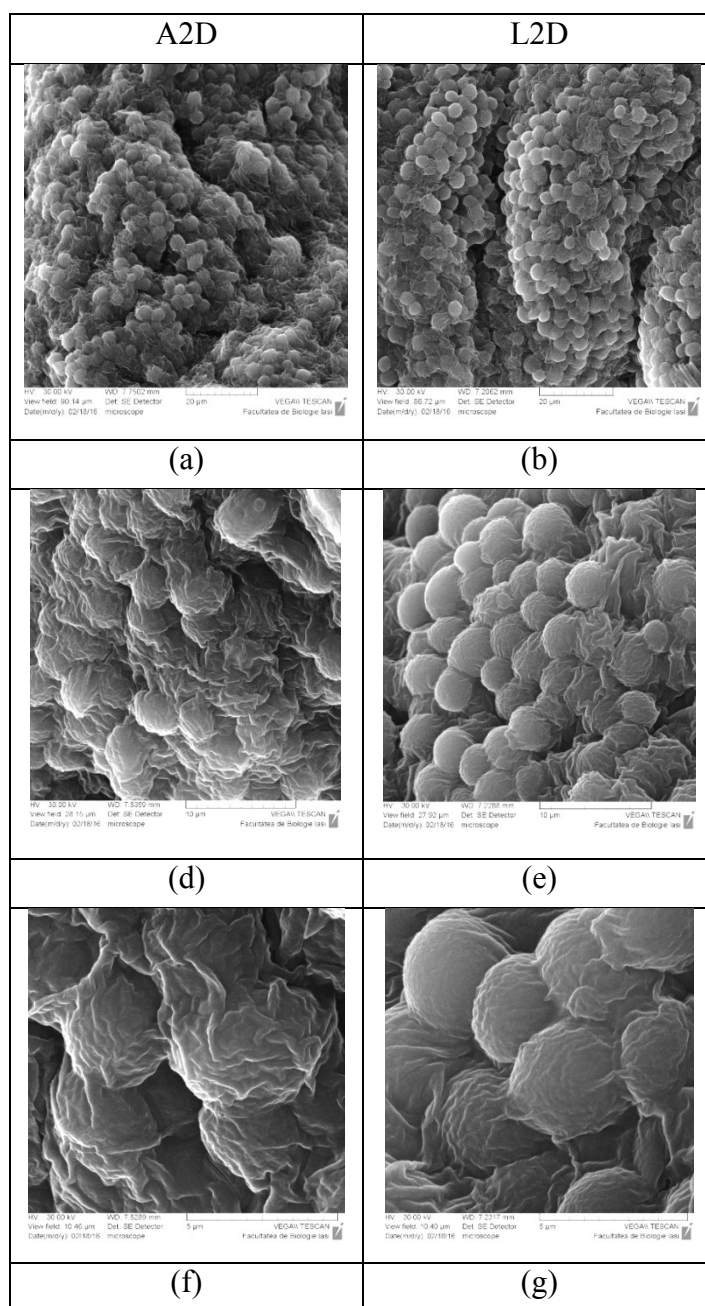


Fig. 53. Fotografii de microscopie electronică de baleiaj pentru particulele A2D și L2D. (3 grade de mărire)

Fotografiile pun în evidență faptul că celulele de drojdie se găsesc în număr mare în interiorul particulelor, fiind bine prinse în matricea polimeră în ambele tipuri de particule.

Dimensiunea celulelor de drojdie este de 3-4 μm . În cazul probei L2 se observă o structură mai poroasă comparativ cu proba A2, tot datorită gradului mai redus de reticulare.

6.3.5. Activitatea fermentativă a particulelor ce conțin celule de drojdie

S-a analizat cinetica procesului de fermentare în prezența mai multor tipuri de particule, monitorizând variația în timp a eficienței de transformare a glucozei. Au fost efectuate mai multe cicluri de fermentare pentru fiecare probă în parte, intervalul de timp dintre cicluri fiind de 24 de ore. Pentru a optimiza procesul de fermentare din punct de vedere al eficienței procesului, s-a studiat influența mai multor factori:

6.3.5.1. Influența concentrației de agent de reticulare din preextrudat.

Au fost selectate probe care diferă prin concentrația de acetat de zinc adăugată înainte de extrudare, restul parametrilor care pot influența procesul de fermentare fiind menținuți constanți. Probele analizate au fost L2D, L4D și L5D. Concentrația de acetat de zinc din soluția de fermentare a fost de 0.01%, pH-ul fiind ajustat la valoarea 6. În figura 54 sunt prezentate curbele de fermentare la probele menționate anterior.

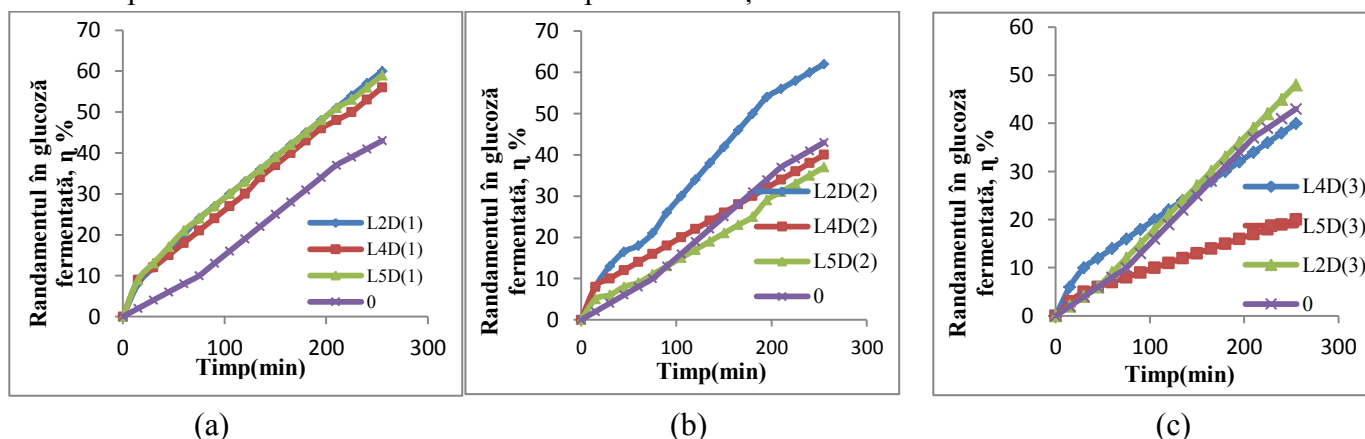


Fig.54: Variația în timp a eficienței fermentării pentru probe la care diferă concentrația de acetat de zinc din preextrudat respectiv după diferite cicluri de fermentare: (a) primul ciclu; (b) al doilea ciclu; (c) treilea ciclu.

Cu creșterea concentrației de acetat de zinc din preextrudat crește gradul de reticulare al particulelor. La particulele cu un grad de reticulare mai ridicat eficiența în fermentare scade. Pentru toate probele analizate se constată că randamentul în fermentare scade de la un ciclu la altul. Proba cu cel mai bun randament în fermentare este L2, deci cu un grad mic de reticulare, considerată ca fiind optimă.

6.3.5.2. Influența concentrației de acetat de zinc din baia de extrudare

Probele selectate sunt A2D, L2D și N2D. PH-ul soluției din baia de fermentare a fost ajustat la valoarea pH = 5, cunoscut fiind faptul că pH-ul optim de proliferare a celulelor de drojdie este cuprins între 4 și 6. În figura 56 sunt prezentate curbele de fermentare a celor trei probe după primul ciclu de fermentare. Soluția de glucoză din fermentator a avut o concentrație de 0.007 % acetat de zinc. Prin scăderea concentrației de reticulant din baia de extrudare eficiența fermentării crește. Efectul se datorează gradului mai mic de reticulare și porozității mai mari a particulelor, având ca efect intensificarea difuziei substratului (glucoza) către celulele de drojdie din matricea de gelan.

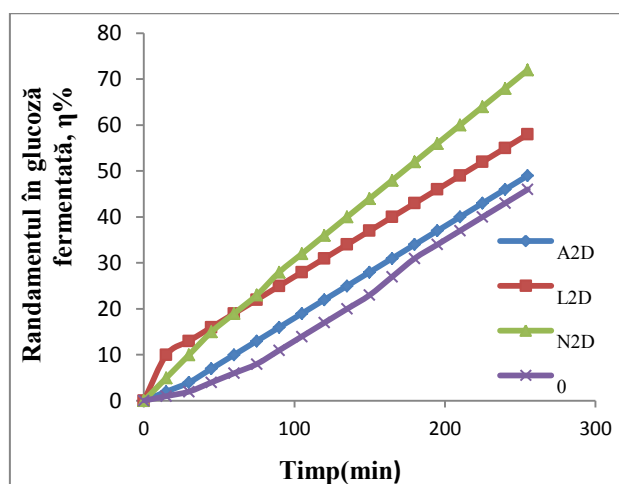


Fig. 56: Variația în timp a eficienței fermentării glucozei pentru probe care diferă prin concentrația de reticulant din baia de extrudare

6.3.5.3. Influența timpului de păstrare a particulelor în baia de extrudare

Pentru a determina timpul optim de păstrare al particulelor în baia de reticulare după extrudare a fost selectată proba L2D. Timpul stabilit pentru păstrarea particulelor în baia de gelificare este de 2 h, respectiv 12 h.

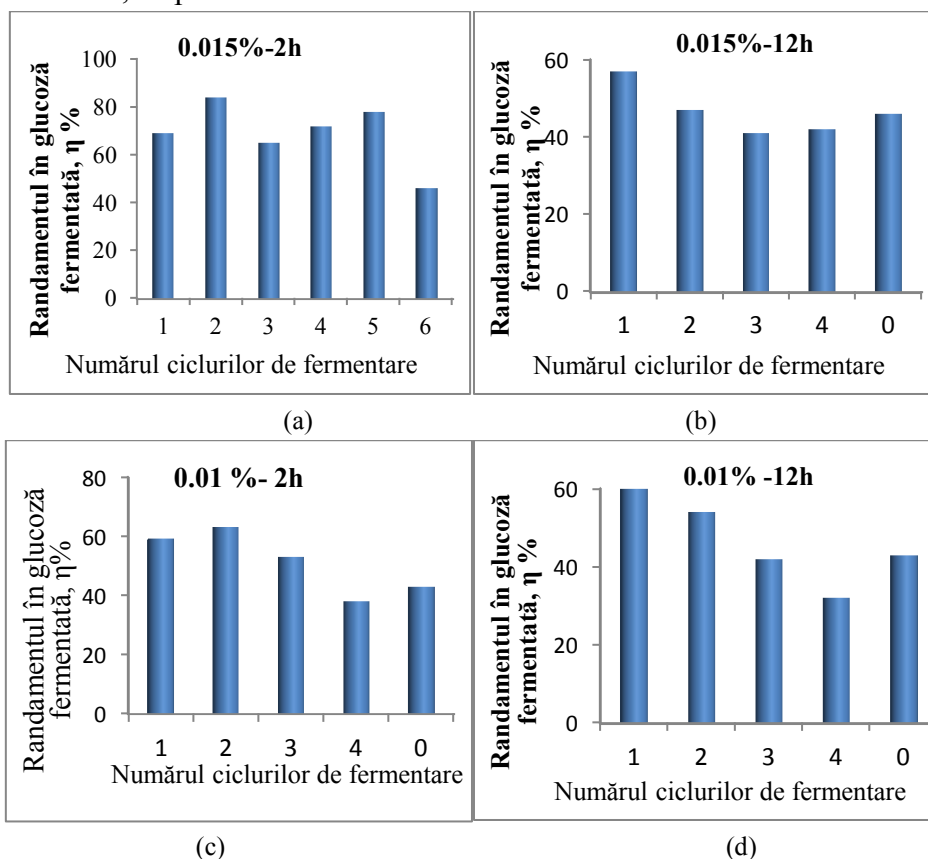


Fig.57: Influența timpului de păstrare al particulelor în soluția de extrudare pentru proba L2D la pH 5 și 0,015% acetat de zinc în baia de fermentare: (a) după 2 ore de păstrare a particulelor în soluția de extrudare, (b) după 12 h de păstrare a particulelor în soluția de extrudare; respectiv la pH 6 și 0,01% acetat de zinc în baia de fermentare (c) după 2 ore de păstrare a particulelor în soluția de extrudare și (d) după 12 ore de păstrare a particulelor în soluția de extrudare.

Păstrarea în soluția de extrudare a particulelor o perioadă mai lungă de timp determină apariția unui grad de reticulare mai mare, sub acțiunea ionului Zn^{2+} . Eficiența fermentării crește atunci când gradul de reticulare este mai mic deoarece nutrienții ce se găsesc în baia de fermentare difuzează mai ușor la celulele de drojdie ce se găsesc în interiorul particulelor de gelan iar acestea pot prolifera. În ambele cazuri analizate se observă că eficiența fermentării crește atunci când particulele sunt păstrate în baia de reticulare timp de 2 ore.

6.3.5.4. Influența pH-ului din baia de fermentare

PH-ul mediului de fermentare nu este considerat de mulți cercetători un factor esențial de influență în procesele fermentative. O serie de studii au relatat însă faptul că pH-ul mediului de fermentare joacă un rol important în asimilarea ionilor metalici de către celulele de drojdie în timpul proceselor fermentative. De asemenea, unele cercetări afirmă că pH-ul are un rol important în legarea cationilor metalici în locurile de absorbție de pe peretele celular al celulei.[57, 563]

S-a utilizat pentru această determinare proba L2D care s-a dovedit cea mai eficientă din punct de vedere al randamentelor de fermentare iar pH-ul din baia de fermentare a fost reglat la valorile 5, respectiv 6.

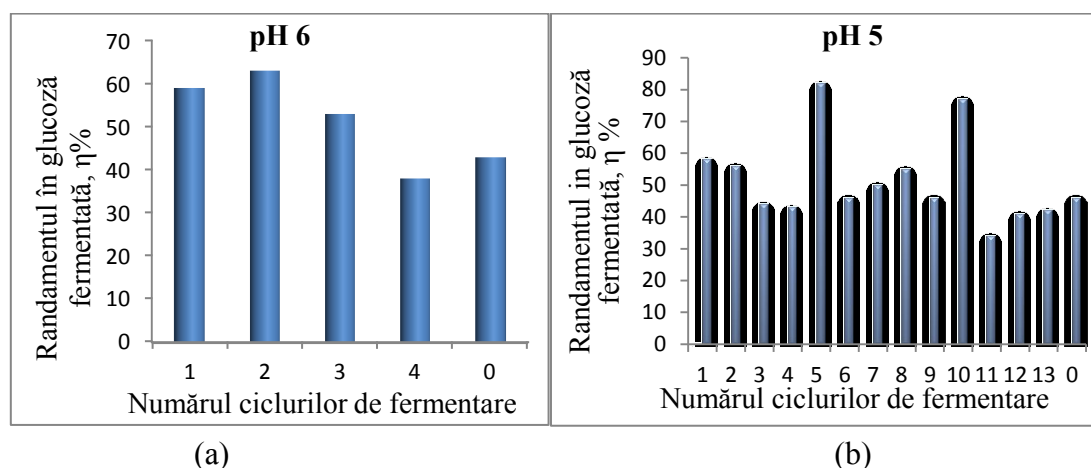


Fig. 58. Randamentele obținute la diferite cicluri de fermentare pentru proba L2D la (a) 6 și (b) pH 5.

Scăzând valoarea pH-ului de la 6 la 5 observăm că eficiența în fermentare crește și este comparabilă cu eficiența pe care o obținem la drojdia liberă; de asemenea, numărul ciclurilor de fermentare crește. Rezultatele obținute ne determină să afirmăm că celulele de drojdie pot prolifera mai eficient în interiorul particulelor de gelan la valoarea 5 a pH -ului.

Rezultatele sunt în acord cu cercetările amintite anterior, care raportează un pH optim al mediului de fermentare cuprins între 4.5 și 5.

6.3.5.5. Influența concentrației de acetat de zinc din baia de fermentare

Pentru proba L2D a fost testată activitatea fermentativă utilizând diferite concentrații de acetat de zinc în baia de fermentare. Concentrația de glucoză dizolvată a fost de 8% și a fost menținută constantă iar pH-ul în baia de fermentare a fost menținut la valoarea pH = 5 în toate cazurile analizate. Testarea activității fermentative pentru probele analizate a avut loc în două medii de fermentare diferite ce se diferențiază prin cantitatea de acetat de zinc în care

este dizolvată glucoza (0.01%, respectiv 0.007%). PH-ul mediului de fermentare în toate cazurile analizate a fost reglat la 5.

În figura 59 sunt prezentate diagramele obținute după mai multe cicluri de fermentare a particulelor în condițiile mai sus menționate.

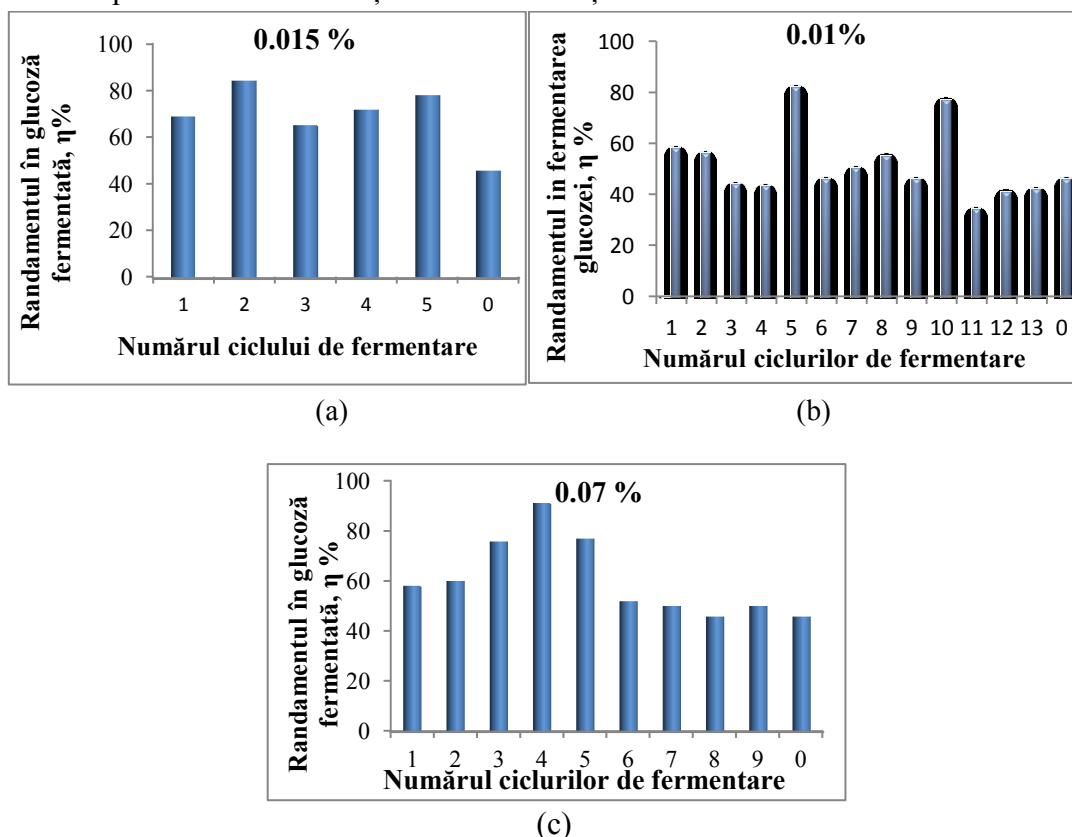


Fig.59. Numărul de cicluri de fermentare realizate cu proba L2D la pH 5 cu diferite concentrații de acetat de zinc în baia de fermentare
(a) 0.015%, (b) 0.01% și (c) 0.007%.

Este evident că eficiența fermentării depinde de concentrația de acetat de zinc din baia de fermentare. Cele mai multe cicluri de fermentare sunt obținute în cazul utilizării unei concentrații de 0,01 % acetat de zinc. Utilizarea unei concentrații mai mici de 0,07% duce la realizarea unui număr mai mic de cicluri de fermentare. Această comportare se datorează faptului că ionul de zinc este un factor de creștere pentru celulele de drojdie în anumite concentrații. O concentrație mai mică în baia de fermentare poate determina o rată de proliferare mai scăzută a celulelor, iar în consecință, randamentul în fermentare poate să scadă.

După fiecare ciclu de fermentare s-a stabilit cantitatea teoretică de celule de drojdie care difuzează în supernatant. Aceasta determinare s-a efectuat pentru a stabili dacă celulele de gelan ce conțin celule de drojdie sunt stabile în mediul de fermentare. Se consideră că din particulele mai puțin stabile pot difuza un număr mare de celule (tabel 27 din teza de doctorat). Numărul de celule care difuzează din particule indiferent de proba analizată este foarte mic ceea ce înseamnă că particulele sunt stabile în mediul de fermentare.

Faptul că particulele cu celule de drojdie pot fi recuperate cu ușurință din fermentator și pot fi reutilizate în mai multe cicluri fermentative arată că matricea de gelan protejează celulele de drojdie de metaboliții toxici produși de etanol, viabilitatea celulară se păstrează iar celulele de drojdie ar putea prolifera în interiorul particulelor de gelan.

Trebuie menționat faptul că matricea polimeră are un rol protector față de celulele imobilizate, permițând proliferarea lor și menținerea viabilității celulare la valori ridicate (tabelul 28).

Tabelul 28 prezintă numărul, cantitatea și viabilitatea celulară care au fost determinate după dezintegrarea particulelor de imobilizat la terminarea fiecărui ciclu fermentativ. Se explică și în acest mod posibilitatea de reutilizare a imobilizatorilor pe parcursul mai multor cicluri de fermentare, cu randamente convenabile, superioare în majoritatea cazurilor celui atins cu drojdia liberă.

Tabel 28. Numărul, cantitatea și viabilitatea celulelor de drojdie de bere imobilizate în matricea de gelan reticulat cu ioni de Zn^{2+} după diferite cicluri fermentative (L2D)

Numărul ciclului de fermentare	Numărul de celule x 10^8 /g particule	Cantitatea de celule/g particule, mg	Viabilitatea celulară, %
0	4.84	17.93	95.43
1	4.94	18.3	91.48
2	6.75	25	92.69
3	8.08	29.94	
4	7.44	27.57	92.82
5	6.6	24.45	
6	6.62	24.53	
7	7.93	29.38	
8	5.51	20.41	91.9
9	6.36	23.56	88.79
10	6.32	23.45	

6.3.6. Productivitatea specifică și viteza de fermentare

Productivitatea specifică în etanol obținută la fermentarea probelor cu celule de drojdie imobilizate este comparabilă (la unele cicluri de fermentare chiar mai bună) cu productivitatea specifică în etanol obținută la drojdia liberă.

6.4. Particule pe bază de amestecuri de gelan și carboximetil celuloză reticulate cu acetat de zinc, conținând celule de drojdie imobilizate

Prezentul subcapitol raportează rezultatele obținute utilizând amestecuri de gelan și CMCNa ca suporturi pentru imobilizarea de celule de drojdie. Imobilizatele au fost realizate prin gelifiere ionotropă în prezența acetatului de magneziu, printr-un proces de extrudare prin capilară a suspensiilor de drojdie în soluția de polimer.

Cele două polizaharide cu care s-a lucrat sunt deci polianioni, care diferă prin masa moleculară (mai redusă la CMCNa) și prin densitatea anionilor carboxilat de-a lungul lanțului polimeric: un anion la fiecare patru cicluri de glucoza din gelan (unitatea structurală) respectiv 0.75 anioni pe fiecare ciclu de glucoză din CMCNa. Rezultă că CMCNa, deși se caracterizează prin masă moleculară mai coborâtă, poate genera rețele mai dense decât gelanul prin reticulare ionotropă cu cationi bivalenți.

Utilizând însă amestecuri ale celor două polizaharide se formează o rețea interpenetrată/interconectată, foarte stabilă. Structura schematică a unei astfel de rețele este prezentată în figura 60. Celulele de drojdie, cu sarcina electrică negativă în suprafață, pot lega ionii de Mg^{2+} consolidând astfel structura rețelei polimere.

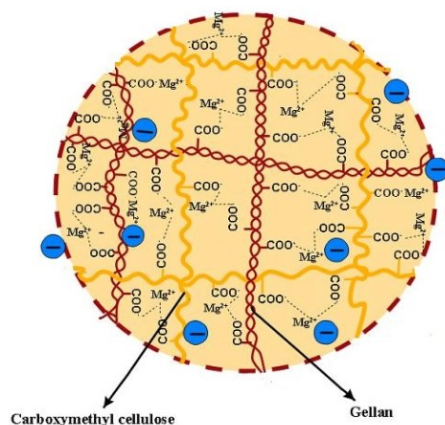


Fig.60. Structura schematică a rețelei ionice interpenetrante/interconectate dintre gelan și CMCNa, formată prin reticulare ionică cu Mg^{2+} .

Tabel 30. Codificarea probelor obținute și compoziția acestora*

Codificarea probei		Gelan (%)	CMCNa (%)
Fără drojdie	Cu drojdie		
P0	PD0	100	0
P1	PD1	80	20
P2	PD2	65	35
P3	PD3	50	50
P4	PD4	35	65

*Concentrația soluției de $Mg(OCOCH_3)_2$ în preextrudat = 0.4%

Concentrația soluției de $Mg(OCOCH_3)_2$ în baia de extrudare = 2%

În toate cazurile, particulele obținute sunt sferice și au diametrul de aproximativ 2.5 mm în stare umflată, așa cum se obțin din procesul de extrudare.

6.4.1. Evaluarea stabilității și a viabilității celulare

Evaluarea stabilității particulelor în medii apoase s-a realizat prin măsurarea transmitanței. În tabelul 31 sunt prezentate rezultatele obținute atât pentru probele cu drojdie cât și pentru cele fără drojdie. Valoare ușor mai coborâtă a transmitanței în apă distilată se obține în cazul particulelor constituite doar din gelan. Se poate deci afirma că particulele de hidrogel formate din amestecuri gelan/CMCNa sunt puțin mai stabile comparativ cu particulele de gelan obținute în aceleași condiții, evident datorită densității mai mari a rețelei.

Totuși cu creșterea cantității de CMCNa se observă o ușoară scădere a valorilor transmitanței. Singura explicație posibilă este aceea că datorită dimensiunii mult mai mici a macromoleculelor de CMCNa comparativ cu cele ale gelanului, cele situate pe suprafața particulelor, nefiind legate în rețea, se pot desprinde în număr tot mai mare odată cu creșterea cantității acestui polimer în amestec. Și la particulele ce conțin drojdie valorile transmitanței scad puțin cu creșterea conținutului de CMCNa, dar se mențin totuși mai mari în comparație cu proba care conține doar gelan.

Tabel 31. Valoarea transmitanței unor medii apoase în care au fost suspendate particulele cu și fără drojdie încapsulată*

Proba	Transmitanța, T%					
	În soluția de extrudare		În apă bidistilată			
	12h	24h	12h	24h	36h	48h
P0	99.8	99.0	99	98.2	96.7	96.7
P1	99.3	99.1	99.8	99.5	98.9	98.6
P2	99.3	98.8	99.5	99.4	98.8	98.5
P3	99	98.4	99.5	99.1	98.7	98.3
P4	98.4	98.2	99.3	98.7	98.3	98.1
P0D	96.3	94.8	96.8	90.2	88	88
P1D	98.4	98	99.1	98.7	98.3	98
P2D	98.4	97.4	99.1	98.6	98.1	97.8
P3D	97.9	97.4	99.2	98.2	97.5	97
P4D	97.3	96.7	99	98.2	97.4	96.9

În cazul tuturor particulelor, cu și fără drojdie încapsulată, stabilitatea scade ușor în timp, păstrându-se totuși ridicată (minimul înregistrat pentru transmitanță este de 96.7%).

Pentru utilizarea în cicluri fermentative repetate a particulelor ce conțin celule de drojdie eficiența biocatalitică depinde mult de viabilitate și de capacitatea de proliferare a celulelor. Tabelul 32 prezintă rezultatele obținute în urma determinărilor efectuate.

Tabel 32. Viabilitatea celulară concentrațiade celule din mediile în care au fost păstrate imobilizatele

Proba	Concentrația celulelor de drojdie (număr celule/ml x 10 ⁴) în supernatant						Viabilitatea celulară, %					
	În soluție de acetat de magneziu 2%		În apă bidistilată				În soluție de acetat de magneziu 2%		În apă bidistilată			
	12h	24h	12h	24h	36h	48h	12h	24h	12h	24h	36h	48h
P0D		16.5	38	58.5			96		95.73	94.15		
P1D	2.5	4.5	1.5	2.5	2.75	4.5	100	94.74	100	90.91	91.66	90
P2D	2.75	6	2	3	3.75	5	100	96	88.89	92.31	93.75	90.9
P3D	7.25	9	2.75	7	9.25	12	100	94.73	100	94.11	94.87	94.11
P4D	7.75	9.5	5.75	8	9.5	14	100	95	94.44	93.33	95	94.92

Cu creșterea concentrației de CMCNa în amestecul de polimeri se observă o creștere a concentrației celulelor. Cu cât crește gradul de reticulare cu atât ochiurile rețelei polimerice sunt mai mici, rețeaua este mai densă și nu mai permite includerea tuturor celulelor, o parte dintre acestea rămânând, probabil, doar adsorbite în suprafață. În cazul probei P0D se poate observa faptul că numărul de celule care difuzează din particule este mult mai mare în comparație cu numărul de celule care difuzează din celelalte probe analizate.

Se observă că viabilitatea celulară are valori ridicate pentru toate probele analizate după diferite perioade de timp. Acestea atestă faptul că matricea polimeră protejează celulele împotriva unor factori degradativi, astfel încât viabilitatea lor se pastrează în timp.

Stabilitatea în medii alcoolice a fost evaluată pentru a evidenția faptul că matricea polimeră în care celulele de drojdie sunt imobilizate le protejează de metaboliții toxici care se

găsesc în etanol. În tabelul 33 sunt prezentate valorile transmitanței și ale viabilității celulare pentru probele P2D și P4D, comparativ cu proba P0D.

Tabel 33. Valorile transmitanței și viabilității celulare în medii alcoolice

Proba	Transmitanța, T%				Concentrația celulelor de drojdie (număr celule x 10 ⁴ /ml)				Viabilitatea celulară, %			
	12h	36h	60 h	84h	12h	36h	60h	84h	12h	36h	60 h	84h
P0D	99.2	98.3	98	97.6	3	3.5	4.5	5.5	100	93.3	90	88
P2D	98.9	98.4	98.2	97.8	1.75	2.75	4	5	87.5	91.66	94.11	90.9
P4D	98.9	98.8	98.6	97.9	3.75	5	6	7.25	93.75	90.91	92.3	90.62

Se poate afirma pe baza rezultatelor obținute, că matricea polimeră alcătuită din cele două polizaharide protejează celulele de drojdie imobilizate de metaboliții toxici din etanol, iar particulele de pe bază de amestec gelan-CMCNa oferă o protecție îmbunătățită celulelor de drojdie imobilizate comparativ cu particulele doar de gelan.

6.4.2. Gradul de umflare în apă

Toate particulele obținute manifestă un puternic caracter de hidrogel, astfel încât s-a considerat utilă și în acest caz evaluarea comportării lor la umflare în apă, prin determinarea variației gradului de umflare pe un interval de timp de 20 ore (fig. 61).

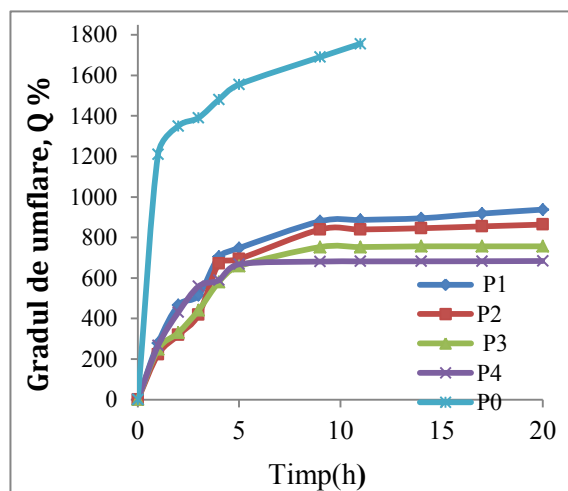


Fig. 61. Cinetica procesului de umflare pentru particule fără drojdie.

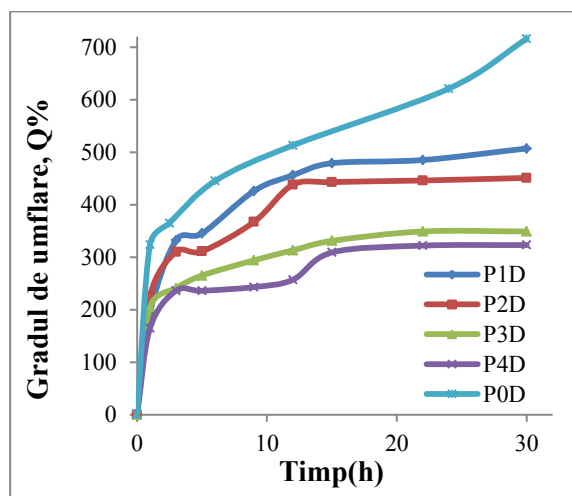


Fig. 62. Cinetica procesului de umflare în apă la particulele ce conțin celule de drojdie imobilizate.

Pentru particulele care conțin CMCNa se obțin valori mai mici ale gradului maxim de umflare comparativ cu P0 (care conține doar gelan), rezultat al densității mai mari de reticulare, în concordanță cu valorile transmitanței discutate anterior. Gradul maxim de umflare scade cu creșterea concentrației de CMCNa în particule, deci cu creșterea gradului de reticulare. Pentru particulele conținând celule de drojdie imobilizate se constată că gradul maxim de umflare pentru toate probele analizate este mai mic comparativ cu cel caracteristic celor fără drojdie (Fig. 62). Acest efect probează încă o dată faptul că celulele de drojdie, cu

sarcini electrice negative pe suprafață, participă practic la reticulare ranforsând structura și rămânând astfel puternic ancorate în rețeaua polimeră.

6.4.3. Morfologia particulelor

Morfologia particulelor în stare de echilibru apă/gheață, ca și uscate a fost evidențiată prin microscopie electronică de baleiaj a secțiunilor acestora. În figura 63 sunt prezentate fotografii corespunzătoare particulelor fără celule de drojdie, realizate prin înghețarea acestora și analiza lor prin tehnica ”environmental”.

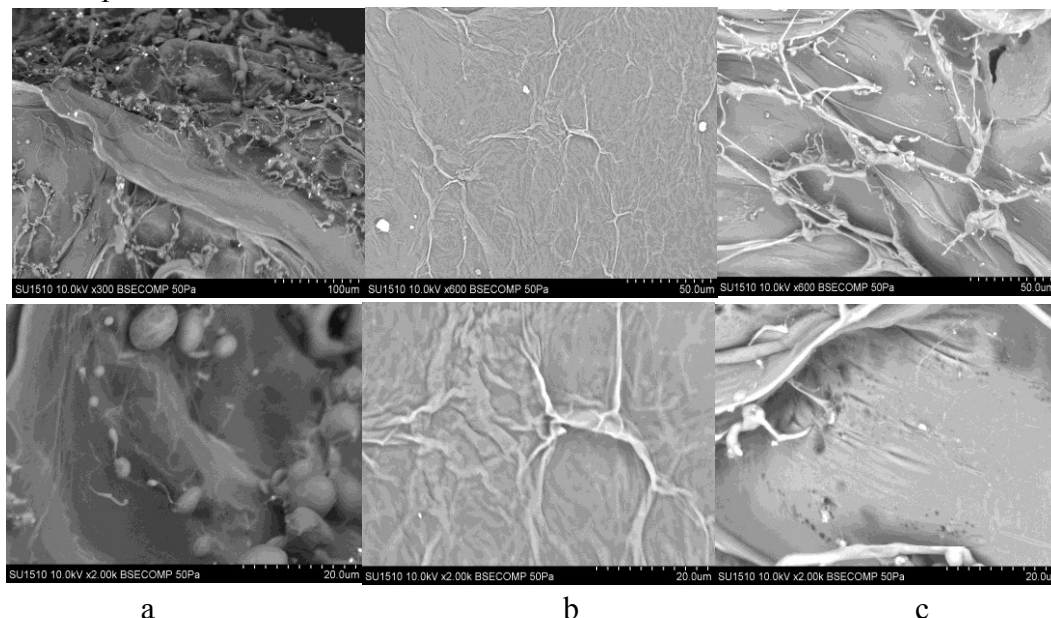


Fig.63. Fotografii de microscopie electronică de baleiaj pentru particule fără celule de drojdie realizate în secțiune pe probe înghețate: P0 (a), P2 (b), P4 (c) (grade diferite de mărire).

Se constată că proba P0, prezintă o secțiune mai neuniformă și o porozitate mai accentuată. Cu creșterea concentrației de CMCNa suprafața particulelor devine tot mai uniformă iar porozitatea scade. În figura 64 sunt prezentate fotografii de microscopie electronică de baleiaj în secțiune transversală pentru particule ce conțin celule de drojdie.

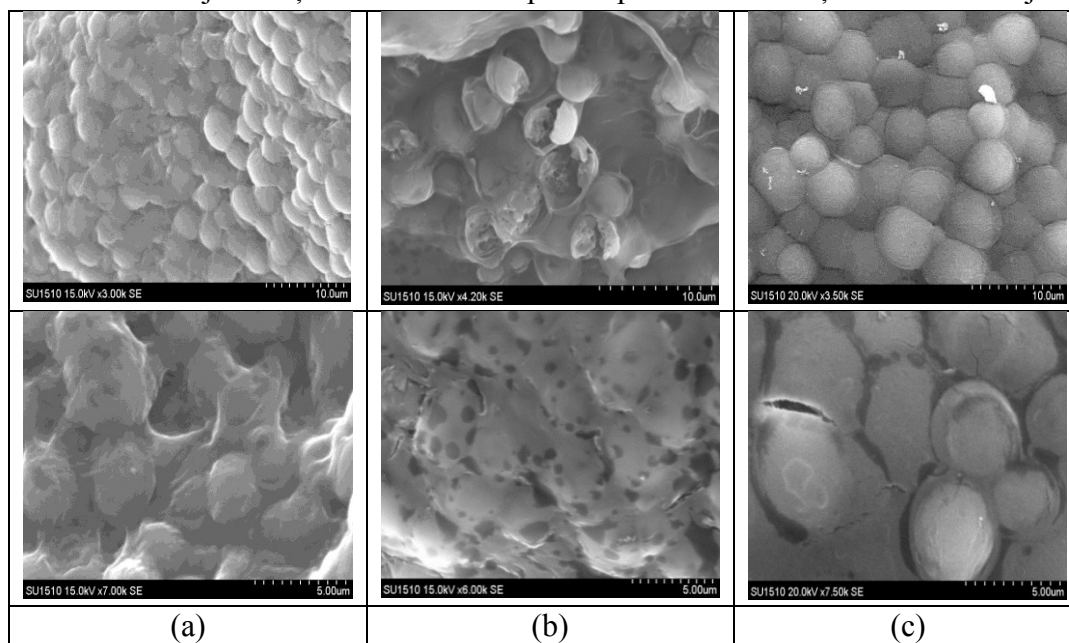


Fig.64. Microscopie electronică de baleiaj pentru particule cu celule de drojdie încapsulată, realizate în secțiune în stare uscată, metalizate: P0D (a), P2D (b), P4D (c) (diferite grade de mărire)

Cu creșterea conținutului de CMCNa, suprafața particulelor devine mai densă, gradul de reticulare al particulelor crește iar porozitatea se diminuează. Trebuie evidențiată populația mare de celule din particulele de imobilizat, atestând faptul că aceste particule pot constitui microbioreactoare utilizabile în procese fermentative.

6.4.4. Evaluarea capacității de fermentare a glucozei în prezența imobilizatorilor obținuți în diferite condiții

Activitatea fermentativă a fost evaluată pentru toate particulele cu drojdie imobilizată obținute, la temperatura de 30°C și pH 5 (dovedit optim în testele anterioare). După fiecare ciclu de fermentare particulele au fost recuperate din fermentator prin filtrare, spălate cu apă bidistilată și păstrate la frigider la temperatura de 4-6°C până la următorul ciclu fermentativ. Fiecare ciclu de fermentare a durat 255 minute iar intervalul dintre cicluri a fost de 24 ore.

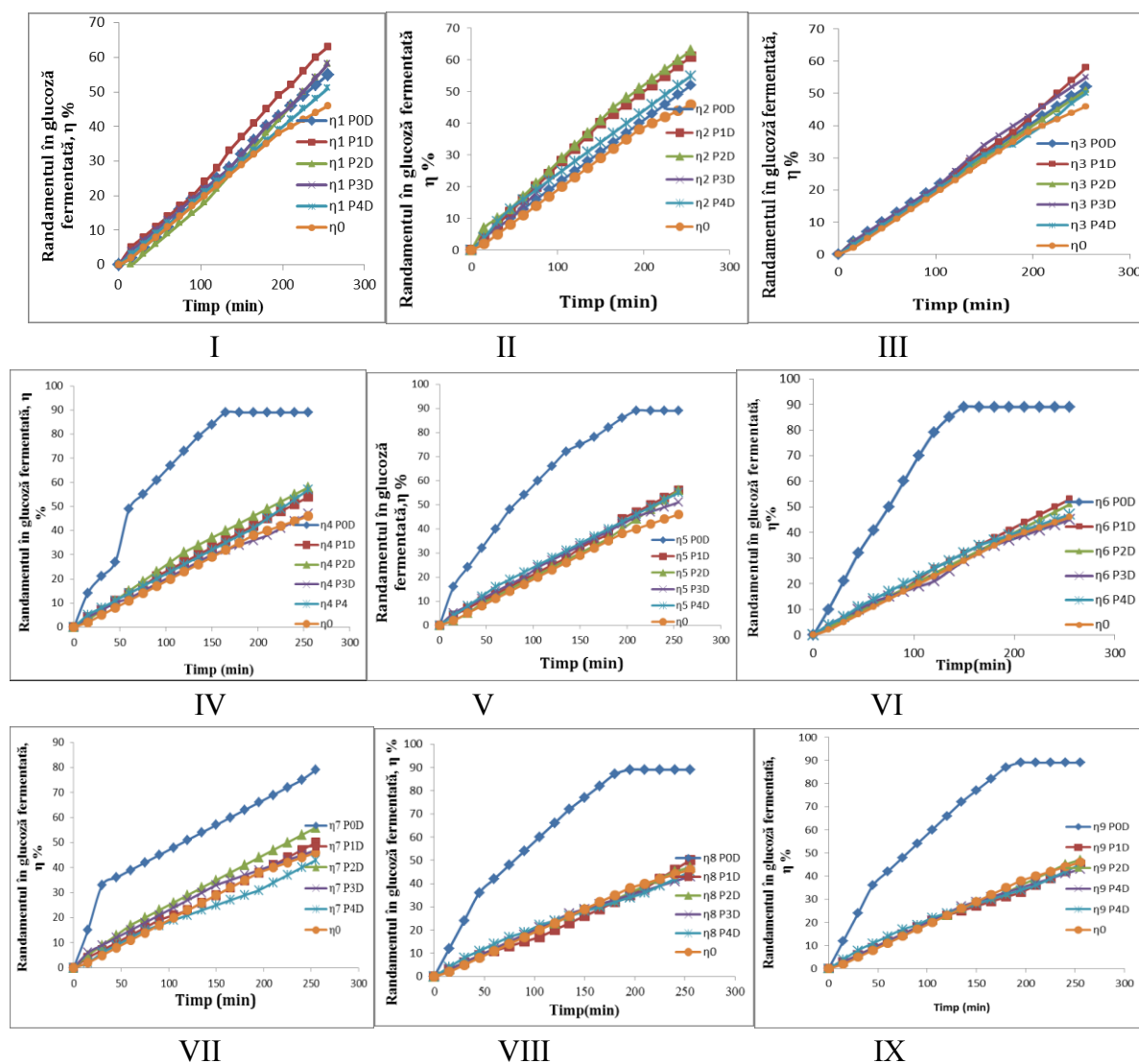


Fig. 65. Evoluția în timp a randamentului în glucoză fermentată pentru 9 cicluri succesive de fermentare, în prezența particulelor de gelan și gelan/CMC ce conțin celule de drojdie. (Indicele numeric reprezintă numărul ciclului de fermentare)

Pentru proba P0D eficiența procesului este mai bună comparativ cu celelalte probe analizate, începând cu cel de al patrulea ciclu de fermentare. Explicația poate fi corelată cu porozitatea mai mare a particulelor, respectiv densitatea de reticulare mai mică, ce facilitează difuzia substratului la celulele de drojdie imobilizate.

Probele de gelan/CMCNa formează o rețea interpenetrată mai densă și mai stabilă datorită gradului de reticulare mai mare, astfel încât din rețea difuzează mai puține celule, cele rămase în matrice determinând o eficiență mai ridicată a fermentării.

Eficiența fermentării cu toate tipurile de bioreactoare analizate, în majoritatea ciclurilor realizate este superioară față de cea obținută la fermentare cu drojdie liberă. Particulele sunt recuperate cu ușurință din fermentator și se pot utiliza în mai multe cicluri de fermentare repetate.

6.4.5. Productivitatea specifică și viteza de fermentare

Viteza procesului de fermentare și productivitatea specifică, calculate pe baza curbelor cinetice, permit următoarele constatări. Vitezele se plasează în aceeași ordine cu randamentul de fermentare pentru toate probele analizate, excepție făcând proba P0D pentru care viteza este superioară începând cu ciclul 4 de fermentare.

Valorile productivității specifice a bioreactoarelor comparativ cu drojdia liberă, pentru câteva cicluri de fermentare alese aleator, sunt prezentate în Tabelul 34.

Tabelul 34. Productivitatea bioreactoarelor pentru cele 5 tipuri de particule conținând celule de drojdie imobilizată, pentru câteva cicluri de fermentare (alegere aleatorie).

Numărul ciclurilor de fermentare	Productivitatea specifică (g etanol/h x g drojdie)					
	Drojdia liberă	P0D	P1D	P2D	P3D	P4D
I	0.57	0.70	0.63	0.60	0.60	0.60
II		0.60	0.80	0.80	0.60	0.60
III		1.83	0.60	0.60	0.80	0.60
IV		1.30	0.60	0.80	0.60	0.60
V		1.73	0.60	0.60	0.60	0.60
VI		2.00	0.60	0.60	0.60	0.60
VII		0.60	0.60	0.80	0.60	0.60
VIII		1.00	0.60	0.60	0.60	0.60
IX		1.57	0.60	0.60	0.60	0.60

6.5. Particule pe bază de amestecuri de gelan, carboximetil celuloză și caragenan reticulate cu acetat de zinc, conținând celule de drojdie imobilizate

Cercetarea întreprinsă de noi are ca scop imobilizarea celulelor de drojdie în matrici obținute din amestecul a trei polizaharide: gelan, i-caragenan și CMCNa, prin metoda gelifierii ionotrope, prin extrudare, utilizând ca agenți de reticulare acetatul de calciu, acetatul de magneziu și acetatul de zinc. Pe baza informațiilor din literatură privind capacitatea diferită de reticulare a unor cationi metalici divalenti, precum și influența acestora asupra proliferării celulelor de drojdie, s-a studiat influența a trei cationi metalici (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}) asupra caracteristicile fizico-chimice ale particulelor cât, mai ales, asupra activității fermentative a bioreactoarelor obținute.

Polizaharidele selectate pentru acest studiu au caracter de polianion, și în consecință capacitatea de gelifiere ionotropă, respectiv de formare a unor rețele cu caracter de hidrogel, datorită caracterului lor puternic hidrofil. Structura schematică a unei astfel de rețele interconectate este prezentată în figura 67. Celulele de drojdie, cu sarcina electrică negativă în suprafață se pot lega de ionii de Me^{2+} consolidând astfel structura rețelei polimere.

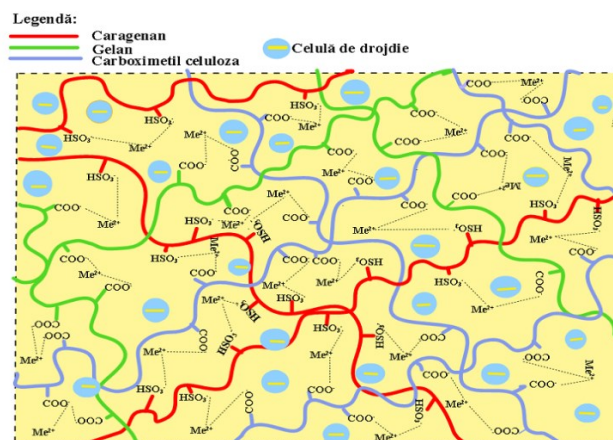


Figura 67. Reprezentare schematică a matricei polimere conținând celule de drojdie imobilizate.

Pentru obținerea particulelor de Gel\CMCNa\Car reticulate ionic cu Ac_2Ca , Ac_2Mg și Ac_2Zn au fost utilizate diferite rapoarte masice ale polimerilor, programul experimental complet fiind prezentat în Tabelul 35.

Tabel 35. Programul experimental

Proba	Gel %	Car %	CMCNa %	Concentrația agentului de reticulare din preextrudat, M^*			Concentrația de agent de reticulare din baia de extrudare, M^{**}		
				Ac_2Mg	Ac_2Ca	Ac_2Zn	Ac_2Mg	Ac_2Ca	Ac_2Zn
D1	40	30	30	2.8×10^{-2}	2.8×10^{-2}	1.1×10^{-3}	2.1×10^{-1}	2.1×10^{-1}	1.1×10^{-2}
D2	40	20	40						
D3	20	40	40						
D4	33	33	33						

*Volumul de soluție de reticulant în preextrudat – 1.25 ml; **volumul de soluție de reticulant în baia de gelifiere - 125 ml.

Particulele cu celule de drojdie imobilizate au același raport masic între polimeri și au fost obținute în aceleași condiții. Pentru a le diferenția față de cele fără celule de drojdie au fost codificate cu D1Y, D2Y, D3Y și D4Y. Toate particulele obținute sunt sferice și au diametrul mediu de 2-3 μm .

6.5.1. Caracterizarea particulelor prin spectroscopie FTIR-ATR

Spectroscopia FTIR a fost utilizată pentru a stabili prezența polizaharidelor în particulele obținute. S-au înregistrat spectrele IR pentru cei trei polimeri (Gel, Car, CMCNa) și spectrele pentru particulele obținute, reticulate cu Ac_2Ca și Ac_2Zn .

6.5.2. Stabilitatea în timp a particulelor fără celule de drojdie în diferite medii (apoase)

Pentru ca particulele să poată fi utilizate în procese fermentative repetate este important ca stabilitatea lor să fie testată în diferite medii apoase. În tabelul 36 sunt prezentate rezultatele obținute la măsurarea transmitanței.

Se poate observa din tabel că valorile transmitanței sunt apropiate indiferent de perioada de păstrare a particulelor în diferite soluții apoase. După 24 de ore de păstrare în soluția de reticulare valorile transmitanței scad ușor, cele mai mici observându-se la particulele reticulate cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$. Pentru acestea, efectul poate fi datorat unei densități de reticulare ușor inferioare celorlalte două rețele, ceea ce face ca macromolecule mai scurte din straturile exterioare ale matricii să se desprinda din rețea mai ușor, difuzând în mediul înconjurător.

Păstrate în apă bidistilată, toate particulele manifestă o ușoară scădere a transmitanței în timp, evident mai mare după 36 ore. Surprinzător, particulele reticulate cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$ se dovedesc acum mai stabile, probabil datorită faptului că după desprinderea unor lanțuri polimere din straturile exterioare în baia de coagulare, nu mai are loc acest proces, miezul matricii fiind mai bine reticulat și deci mai stabil structural.

Tabel 36. Valorile transmitanței pentru probele fără celule de drojdie determinată după diferite perioade de păstrare în medii apoase.

Proba	Transmitanța, T %				
	În baia de coagulare		În apă bidistilată		
	12h	24 h.	12h	24h.	36h.
D1Mg	99.60	98.70	99.00	98.50	97.10
D2Mg	99.60	98.50	99.10	98.50	97.80
D3Mg	99.60	99.10	98.90	98.00	95.50
D4Mg	99.40	99.20	99.20	98.50	95.30
D1Ca	99.40	98.20	98.90	97.30	96.0
D2Ca	98.90	98.10	99.20	97.90	96.10
D3Ca	99.10	98.40	98.50	97.00	95.90
D4Ca	98.30	98.00	98.80	97.20	96.80
D1Zn	98.70	96.80	99.70	99.00	96.70
D2Zn	98.30	97.10	99.70	99.10	97.50
D3Zn	99.30	97.30	99.70	98.50	97.60
D4Zn	99.50	97.30	99.50	98.70	98.00

Creșterea cantității de caragenan în particule este posibil să influențeze valorile transmitanței obținute deoarece poate determina creșterea porozității acestora. În consecință, crește absorbția de apă, ceea ce poate provoca tensiuni mai mari în rețeaua polimeră, finalizate cu distrugerea sa parțială și desprinderea unor fragmente de macromolecule care determină reducerea ușoară a transmitanței.

Se poate aprecia, în concluzie, că valorile mari ale transmitanței atestă stabilitatea în timp a particulelor fără celule de drojdie, în medii apoase, confirmând astfel rezultatele anticipate pe baza studiilor anterioare raportate în subcapitolele 6.1-6.4.

6.5.3. Stabilitatea în timp a particulelor cu celule de drojdie imobilizate – evaluarea concentrației de celule difuzate și a viabilității celulare

Pentru a determina dacă particulele cu celule de drojdie imobilizate sunt stabile în medii apoase s-a determinat valoarea transmitanței, a concentrației de celule/ml și viabilitatea celulară în soluția din baia de reticulare sau în apă bidistilată. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 37.

O primă constatare este aceea că valoarea transmitanței scade cu timpul de păstrare în cele două medii apoase, dar se pastrează la valori destul de ridicate. Cea mai ridicată stabilitate o au, în general, particulele reticulate cu Zn^{2+} .

După 24 de ore de păstrare în apă bidistilată probele D3YZn și D4YZn au cele mai mici valori ale transmitanței comparativ cu aceleași probe reticulate cu $(CH_3COO)_2Mg$ sau $(CH_3COO)_2Ca$, probabil tot datorită porozității mai mari induse de caragenan; efectul este același la probele reticulate cu Ca și Mg, conținând cantități mai ridicate de caragenan.

Dacă transmitanța ar fi influențată doar de creșterea porozității din particule, ar trebui să varieze în următoarea ordine:

$$T\% : D2Y > T\% D1Y > T\% D4Y > T\% D3Y$$

Pentru majoritatea probelor analizate, indiferent de agentul de reticulare utilizat, valorile transmitanței variază în această ordine.

Tabel 37. Valoarea transmitanței și a viabilității celulare în diferite medii la câteva probe analizate

Proba	Transmitanța, T%				Concentrația celulelor de drojdie (nr. celule x 10^4 /ml)				Viabilitatea celulară, %		
	În baia de reticulare		În apă bidistilată		În baia de reticulare		În apă bidistilată		În baia de reticulare	În apă bidistilată	
	12h	24h	12h	24h	12h	24h	12h	24h	24h	12h	24h
D1YMg	96.60	93.20	99.10	98.30	6.75	8.50	2.75	5.25	94.44	95.45	93.62
D2YMg	96.00	94.00	98.80	98.30	14.75	19.00	7.25	9.50	96.20	95.83	94.64
D3YMg	95.90	94.30	98.20	96.90	10.00	14.70	9.75	14.50	96.72	96.67	96.59
D4YMg	96.50	94.70	98.80	97.50	9.75	13.00	5.25	7.00	96.30	96.55	92.68
D1YCa	98.20	96.50	99.30	98.50	13.00	17.25	4.25	7.50	95.34	95.45	95.24
D2YCa	97.30	95.60	99.30	98.40	22.00	30.00	3.00	7.50	96.70	94.74	93.00
D3YCa	93.50	92.00	98.70	96.80	40.00	50.00	25.00	33.75	95.24	94.33	93.10
D4YCa	96.00	94.70	98.90	96.90	13.00	15.00	3.25	9.50	95.24	96.00	94.33
D1YZn	98.90	96.50	99.70	98.60	13.00	17.25	1.75	8.00	95.83	87.50	86.50
D2YZn	98.50	98.40	99.50	99.00	22.00	30.00	3.00	5.75	95.23	92.30	88.46
D3YZn	95.70	90.50	95.00	86.50	25.00	35.00	12.50	20.00	93.30	94.33	90.91
D4YZn	98.60	98.50	97.90	95.30	13.00	15.00	3.25	11.70	92.30	92.85	92.16

Concentrația de celule de drojdie crește cu durata de păstrare a imobilizatului în mediul lichid, și prezintă cele mai ridicate valori la probele care au cantități mai mari de caragenan în compoziție (D3Y, D4Y).

Scopul determinării viabilității celulare în mediile în care particulele au fost păstrate a fost acela de a determina dacă matricea polimeră poate păstra viabilitatea celulară o perioadă mai mare de timp. Valorile mari ale viabilității celulare, care variază între 86,5% și 96,59% atestă faptul că matricea polimeră poate păstra viabilitatea celulară la valori optime în timp.

6.5.4. Capacitatea particulelor de a reține apa

Comportamentul în apă al particulelor sferice de gelan/i-caragenan/CMCNa cu și fără celule de drojdie, s-a evaluat prin gradul de umflare (Q %). În figura 69 este prezentată variația în timp a gradului de umflare pentru toate probele obținute.

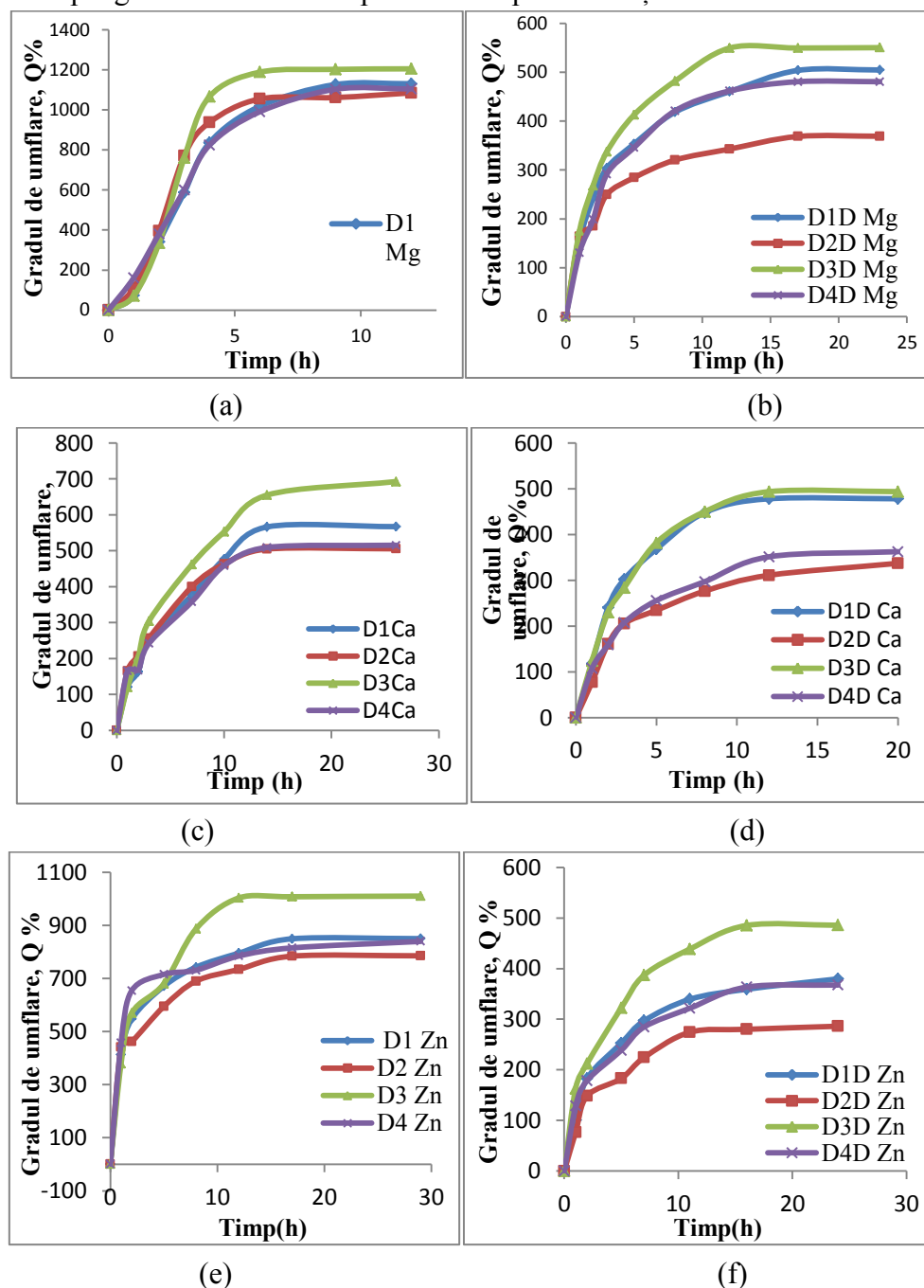


Fig.69. Variația în timp a gradului de umflare pentru probele obținute: (a) probe fără celule de drojdie reticulate cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, (b) probe cu celule de drojdie imobilizată reticulate cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, (c) probe fără celule de drojdie reticulate cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$, (d) probe cu

celule de drojdie imobilizată reticulate cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$, (e) probe fără celule de drojdie reticulate cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$, (f) probe cu celule de drojdie imobilizată reticulate cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$.

O primă constatare este aceea că variația gradului de umflare în timp depinde de cantitatea de caragenan din amestecul de polimeri. Astfel, în majoritatea cazurilor analizate, cu cât aceasta crește, cu atât valoarea Q crește, efect evident datorat creșterii porozității particulelor. Ordinea de variație a Q , atât pentru particule cu și fără drojdie, indiferent de agentul de reticulare utilizat este următoarea:

$$Q_{D3} > Q_{D1} > Q_{D4} > Q_{D2}$$

Valoarea gradului de umflare este determinată și de gradul de reticulare al particulelor, respectiv de numărul de grupe anionice (carboxilat, sulfat) participante la formarea legăturilor ionice cu metalul. Se explică astfel că proba D2 prezintă, indiferent de reticulantul folosit, cea mai mică valoare a Q : ea conține cantitatea maximă de CMCNa (care crește densitatea de reticulare) și minimă de caragenan (care crește porozitatea). Atât la probele fără drojdie cât și la cele care conțin celule de drojdie valoarea gradului de umflare depinde și de tipul de agent de reticulare utilizat; considerând acest criteriu, gradul de umflare variază în ordinea:

$$Q_{\text{Mg}^{2+}} > Q_{\text{Zn}^{2+}} > Q_{\text{Ca}^{2+}}$$

Este cunoscut faptul că cationii de Ca^{2+} determină obținerea de geluri mai puternice decât cele obținute cu Mg^{2+} [276]. Concentrația utilizată pentru $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$ în baia de reticulare a fost mult mai redusă (de ordinul 10^{-2} M) dar suficientă pentru a asigura un grad de reticulare comparabil cu cel realizat de ceilalți cationi divalenți, datorită implicării ionului de Zn^{2+} și în reacții de complexare; cantități mai mari din acest reticulant pot deveni toxice pentru celule [32]. Pentru probele care conțin celule de drojdie valoarea gradului de umflare este mai mică comparativ cu particulele fără celule de drojdie.

6.5.5. Morfologia particulelor

A fost selectată pentru analiză prin microscopie electronică de baleiaj proba D4Y reticulată cu cei trei cationi, deoarece polimerii constituenți participă în aceeași proporție. În figura 70 sunt prezentate fotografiile de microscopie electronică.

Fotografiile de microscopie electronică de baleiaj evidențiază faptul că celulele se află în număr mare în particule și sunt bine prinse în rețeaua polimeră. Particulele prezintă o porozitate adecvată care ar permite schimbul de nutrienți între celule și mediul de fermentare. Cationii metalici utilizați pot influența gradul de reticulare al particulelor.

Morfologia indusă de Ca^{2+} este mai densă ceea ce ar putea fi o consecință a unui grad de reticulare mai mare. Particulele reticulate cu Mg^{2+} prezintă o porozitate mai mare, rețeaua este mai puțin densă determinată și de un grad de reticulare mai mic în comparație cu proba reticulată cu ioni de calciu. Particulele reticulate cu ioni de Zn^{2+} prezintă o densitate comparabilă cu cele reticulate cu Ca^{2+} , chiar dacă concentrația reticulantului este cu un ordin de mărime mai mic decât în celelalte două cazuri; efectul a fost explicat anterior.

Morfologia particulelor este în concordanță cu rezultatele prezentate anterior.

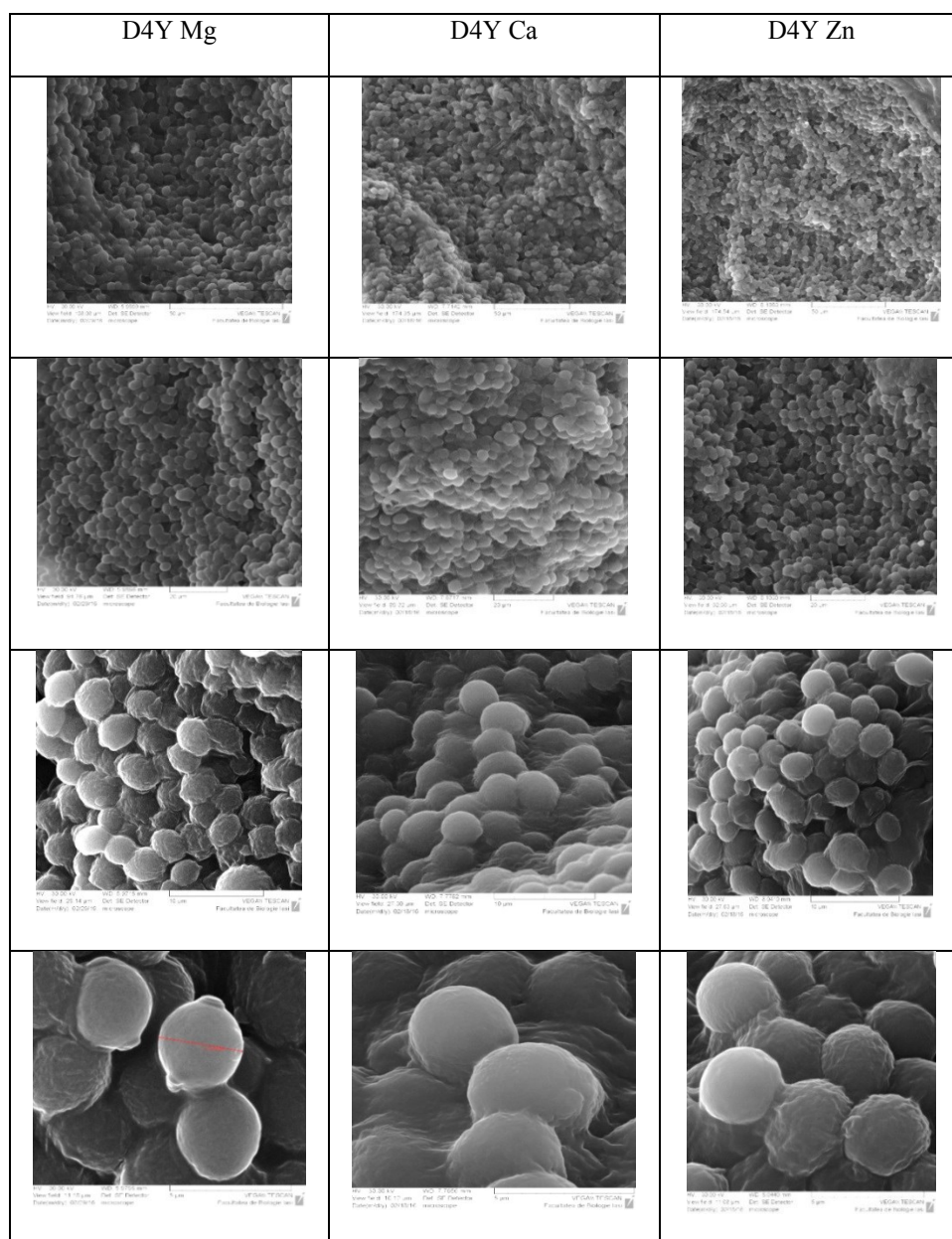


Fig. 70. Fotografii efectuate prin microscopie electronică de baleiaj pentru proba D4Y utilizând ca agenți de reticulare $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ și $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$.

6.5.6. Testarea activității fermentative a imobilizatorilor

Testarea activității fermentative pentru toate probele a condus la randamente ridicate, comparabile cu drojdia liberă. Figura 71 prezintă variația randamentelor de fermentare în timp pentru cele 4 probe D1Y, D2Y, D3Y și D4Y reticulate cu acetat de magneziu.

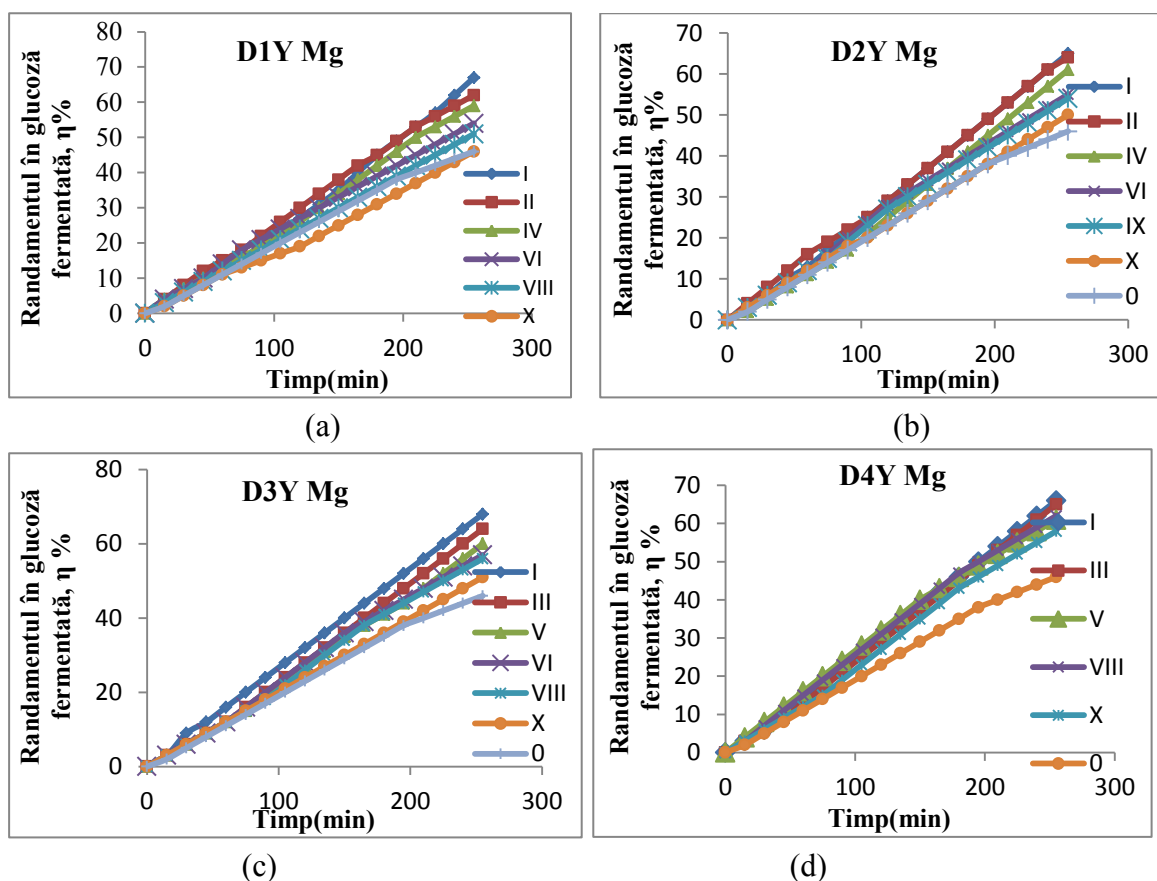
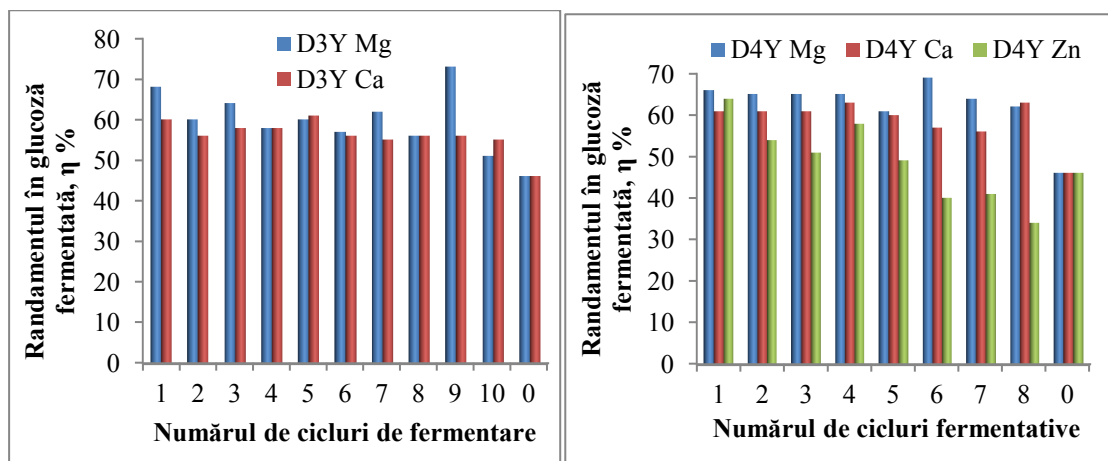


Fig.71. Variația randamentului de fermentare a glucozei în timp pentru mai multe cicluri de fermentare diferite (notate de la I la X) pentru probe reticulate cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$: (a) D1Y, (b) D2Y, (c) D3Y, (d) D4Y. Randamentele obținute după fiecare ciclu de fermentare au fost comparate cu randamentul obținut la fermentarea drojdiei libere (notația 0 în figuri).

Se constată că pentru toate cele 4 probe randamentele în fermentare sunt apropiate între ele și sunt mai mari decât cel obținut la fermentarea drojdiei libere. Valorile cele mai mari au fost obținute cu probele D3Y și D4Y, care prezintă și valorile cele mai ridicate ale gradului de umflare. Există deci o legătură directă între capacitatea de umflare a particulelor în medii apoase și capacitatea de fermentare. Se observă că eficiența în fermentare scade în timp de la un ciclu la altul dar are totuși o valoare superioară celei obținute la fermentarea cu drojdie liberă. Pentru particulele D3Y și D4Y reticulate cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ s-au putut realiza, de asemenea, 10 cicluri de fermentare, valoarea randamentelor fiind ridicată, comparabilă în majoritatea cazurilor cu cele obținute cu particulele reticulate cu Mg^{2+} .

În schimb, pentru cele reticulate cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$ s-au putut realiza doar 4 cicluri de fermentare pentru proba D3Y și 8 cicluri de fermentare pentru proba D4Y. Proba pentru care s-au obținut cele mai puține cicluri fermentative conține mai multe grupe funcționale reticulabile în comparație cu proba D4Y, ceea ce conduce la o cerință mai mare de ioni de zinc pentru reticulare.



(a)

(b)

Fig. 72. Comparație între valoarea maximă a randamentelor de fermentare a glucozei în prezența drojdiei libere (0), respectiv a drojdiei imobilizate în particule de tip D3Y și D4Y reticulate cu diferiți ioni metalici: (a) proba D3Y reticulată cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ (D3Y Ca) și $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ (D3Y Mg), (b) proba D4Y reticulată cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ (D4Y Ca), $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ (D4Y Mg) și $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$ (D4Y Zn).

Obținerea randamentelor în fermentare comparabile la fiecare ciclu de fermentare pentru probele D3Y și D4Y reticulate cu Mg^{2+} și Ca^{2+} poate fi un rezultat al schimbului eficient de nutrienți între mediul de fermentare și celulele imobilizate. Începând cu ciclul 9 de fermentare apare însă o tendință de scădere a randamentelor.

Pentru proba D4YZn, figura 72 b demonstrează că la primul ciclu de fermentare se obține un randament maxim care depășește pe cel corespunzător probei D4YCa și este aproape egal cu randamentul obținut de proba D4YMg. Randamentul scade apoi începând cu ciclul 2 până la ciclul 8 după care fermentarea se oprește; excepție face ciclul 4 unde se înregistrează, surprinzător, o creștere a acestuia comportament care se poate datora deficienței în ioni de Zn^{2+} .

6.5.7. Evaluarea viabilității celulare și a cantității de celule din particule după fiecare ciclu de fermentare

Tabel 38. Viabilitatea celulară și numărul de celule/gram de particule

Numărul ciclului de fermentare	Numărul de celule $\times 10^{-8}/\text{g}$ particule			Viabilitatea celulară, Vc %		
	D4Y Mg	D4Y Ca	D4Y Zn	D4Y Mg	D4Y Ca	D4Y Zn
0*	4.65	5.14	4.41	95.93	96.51	97.08
I	5.23	5.91	5.47	95.92	94.54	96.48
VI	7.81	8.74	9.44	95	94.7	92.15
VIII	7.35	7.55	8.8	94.32	94.05	91.98
X	8.21	6.91	7.54	92.95	88.61	87.79

Viabilitatea celulară la particulele analizate scade ușor de la un ciclu de fermentare la altul dar se păstrează la valori ridicate ceea ce indică faptul că matricea polimeră protejează

destul de eficient celulele. Figura 74. prezintă evoluția cantității de celule/g particule funcție de numărul ciclului de fermentare pentru proba D4Y comparativ cu randamentul maxim obținut după fiecare ciclu de fermentare.

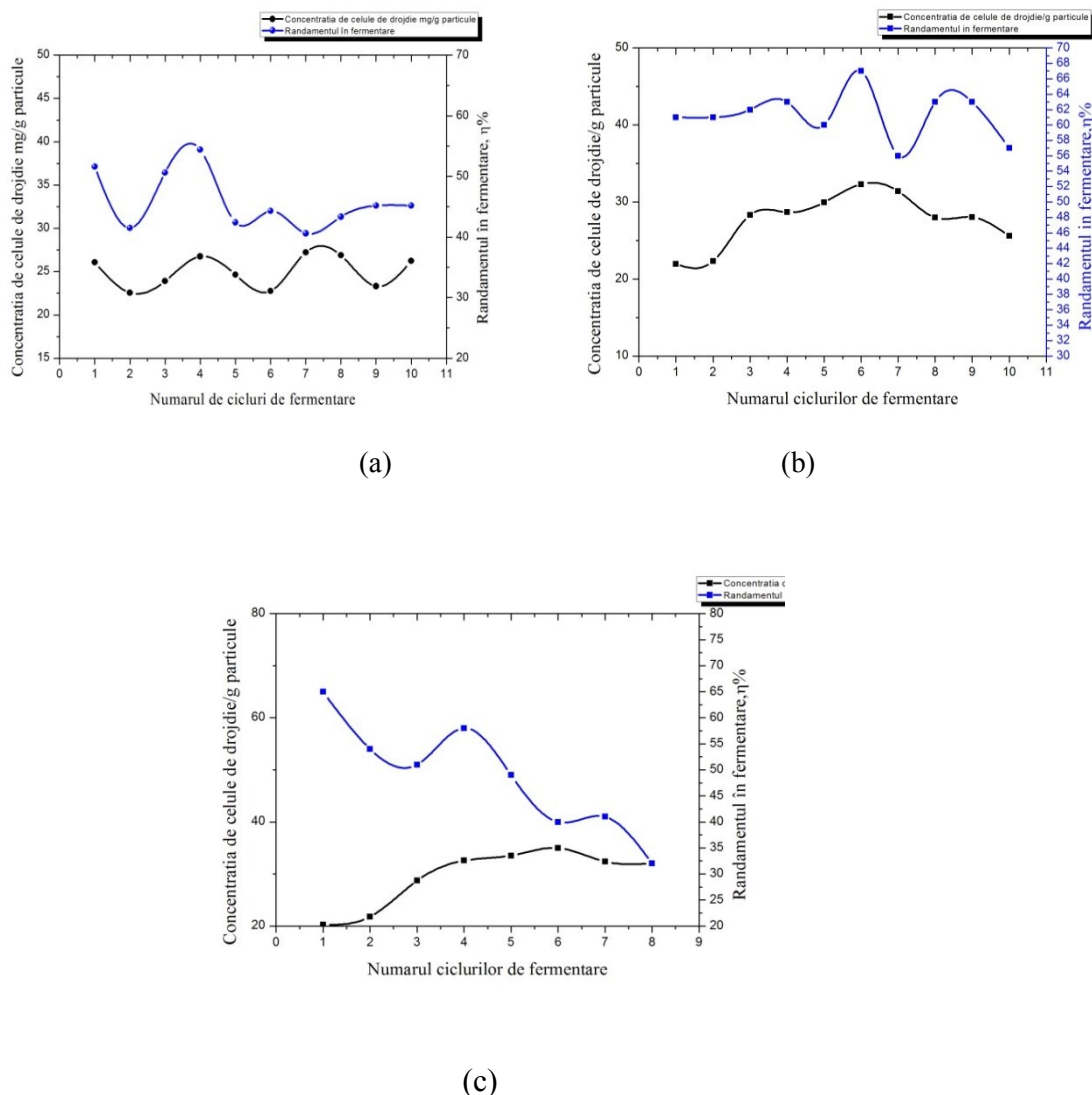


Figura 74. Evoluția în timp a cantității de celule din particule funcție de numărul de cicluri de fermentare pentru proba D4Y reticulată cu: (a) $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, (b) $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ și (c) $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$

Pentru particulele D4YMg cantitatea de celulele de drojdie crește constant de la un ciclu de fermentare la altul până după ciclul 8. O scădere apare după ciclul 8 de fermentare, urmată apoi de o ușoară tendință de creștere. Valoarea maximă a randamentului în fermentare urmează practic aceeași evoluție până la ciclul 8 (când se înregistrează un maxim), în perfectă concordanță cu evoluția cantității de celule din particule.

O foarte bună concordanță între cele două mărimi analizate este evidențiată în cazul D4YCa. Cantitatea de celule de drojdie crește până la ciclul 6, după ciclul 7 având tendința să scadă. Similar variază randamentul maxim de fermentare.

Ionii de zinc pot avea două efecte contrare: pe de o parte conduc la creșterea numărului de celule de drojdie în interiorul matricei polimere deoarece zincul are rol de

activator enzimatic (efect ce se constată și în cazul nostru), pe de altă parte complexează atât cu grupele funcționale din amestecul de polimeri cât și cu proteinele care aparțin membranelor celulare. Se formează astfel legături coordinative foarte puternice iar productivitatea în etanol scade datorită aglomeratelor celulare formate în timp și a limitării difuziei nutrienților. Prin studiul nostru am dorit să stabilim dacă celulele sunt bine prinse în rețeaua polimeră și nu difuzează în număr mare în mediul de fermentare chiar și după mai multe cicluri de fermentare.

Tabelul 39. Cantitatea de celule de drojdie difuzate din particule după fiecare ciclu de fermentare

Proba	Numărul total de cicluri de fermentare	Numărul total de celule din mediul de fermentare/ml x 10 ⁴	Cantitatea totală de celule de drojdie care difuzează din particule, mg
D3Y Mg	10	167.25	2.9052
D4Y Mg	10	128	2.4613
D3Y Ca	10	169.5	3.496
D4Y Ca	10	139.25	2.85076
D3Y Zn	4	41.75	1.18312
D4Y Zn	8	56	1.24564

Rezultatele din tabelul 37 demonstrează că din particulele testate în procesul de fermentare sunt stabile iar din particule difuzează un număr mic de celule, mult inferior celui rămas în particule. Faptul că particulele cu celule de drojdie pot fi recuperate cu ușurință din fermentator și pot fi reutilizate în mai multe cicluri fermentative arată că matricea polimeră în care celulele de drojdie sunt imobilizate le protejează de metaboliții toxici produși de etanol, viabilitatea celulară se păstrează iar celulele de drojdie pot prolifera în interiorul particulelor obținute.

6.5.8. Productivitatea specifică și viteza de fermentare

Tabel 40. Productivitatea specifică și viteza procesului de fermentare

Numărul ciclului de fermentare	Viteza de fermentare, % conversie glucoză/min						Productivitatea specifică (g etanol / h x g celule de drojdie)					
	D3Y Mg	D4Y Mg	D3Y Ca	D4Y Ca	D3Y Zn	D4Y Zn	D3Y Mg	D4Y Mg	D3Y Ca	D4Y Ca	D3Y Zn	D4Y Zn
I	0.27	0.22	0.24	0.2	0.2	0.2	0.79	0.79	0.79	0.79	0.59	0.79
II	0.27	0.24	0.2	0.27	0.2	0.2	0.7	0.79	0.59	0.79	0.59	0.59
III	0.2	0.2	0.2	0.22	0.16	0.2	0.79	0.77	0.76	0.79	0.4	0.59
IV	0.2	0.27	0.2	0.27	0.2	0.2	0.79	0.79	0.76	0.79	0.4	0.79
V	0.2	0.27	0.22	0.22		0.2	0.79	0.79	0.79	0.79		0.59
VI	0.2	0.2	0.2	0.27		0.2	0.59	0.79	0.59	0.62		0.59
VII	0.27	0.24	0.2	0.2		0.2	0.79	0.72	0.59	0.59		0.59
VIII	0.2	0.24	0.2	0.2		0.13	0.59	0.82	0.59	0.79		0.4
IX	0.29	0.2	0.2	0.22			0.98	0.79	0.79	0.79		
X	0.2	0.2	0.22	0.27			0.59	0.63	0.79	0.79		

Viteza de fermentare pentru drojdia liberă este de 0.067 % conversie glucoză/ min iar productivitatea specifică pentru drojdia liberă este de 0.51 g etanol/g glucoză x g drojdie. Se constată că viteza procesului se plasează în aceeași ordine cu valorile randamentului de fermentare, pentru toate probele analizate. Viteza de fermentare pentru majoritatea ciclurilor fermentative efectuate este superioară celei obținute la fermentarea cu drojdie libere.

Pentru majoritatea probelor productivitatea specifică în etanol este mai mare decât productivitatea specifică a drojdiei libere. Cele mai bune productivități au fost obținute cu proba D4Y reticulată cu acetat de magneziu.

Capitolul 7

Imobilizarea α -amilazei în particule de gelan reticulat ionic.

Rezultatele raportate în acest capitol se referă la imobilizarea prin includere a α -amilazei într-o matrice sferică de gelan, reticulat ionic cu Mg^{2+} , utilizând ca tehnică extruderea prin capilară a soluției de polizaharid conținând enzima.

Obținerea particulelor de gelan reticulat ionic are la baza reacția de schimb ionic dintre gelan (sare de sodiu) și acetatul de magneziu, prezentată în subcapitolul 5.2.

Tabel 41. Planul experimental de obținere a imobilizatorilor de α -amilază *

Proba	Concentrația soluției de α -amilază (mg/ml)	Eficiența în imobilizare, E_i %
P1	1	61.9
P2	2	68.27
P3	3	74.63
P4	4	65.5

* -concentrația soluției de gelan: 1%

- concentrația soluției de acetat de magneziu în baia de gelificare: 2 %

- pH-ul soluției tampon acetat utilizată: 5.6.

- temperatura de imobilizare: 60°C.

Particulele obținute sunt sferice și au diametrul mediu de 2.5 mm.

Eficiența în imobilizare a enzimei s-a determinat pe baza cantității de enzime din supernatant. Cantitatea de proteine din supernatant s-a determinat utilizând metoda Lowry. Eficiența maximă în imobilizare a fost obținută utilizând o concentrație de 3 mg/ml enzime și a fost de 74, 63%.

Structura schematizată a particulelor obținute este prezentată în figura 77.

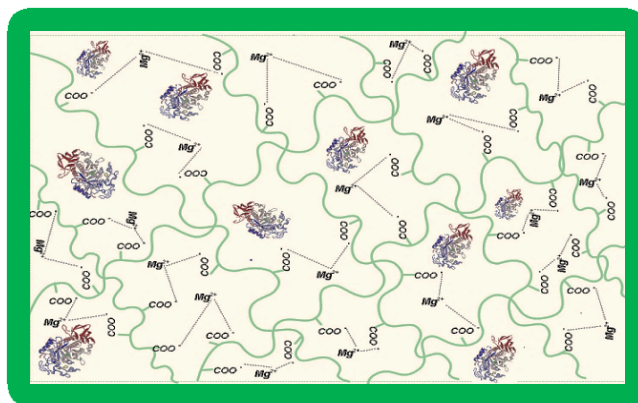


Fig.77. Structura schematizată a α -amilazei imobilizate în particule de gelan reticulat ionic

7.1. Morfologia particulelor cu α -amilază imobilizată

În particulele analizate prin microscopie electronică de baleiaj a fost imobilizată aceeași cantitate de α -amilază iar probele diferă prin concentrația de agent de reticulare utilizată în baia de gelifiere, respectiv 1% și 2 % acetat de magneziu. Probele au fost uscate iar fotografiile de microscopie electronică de baleiaj au fost realizate în secțiune.

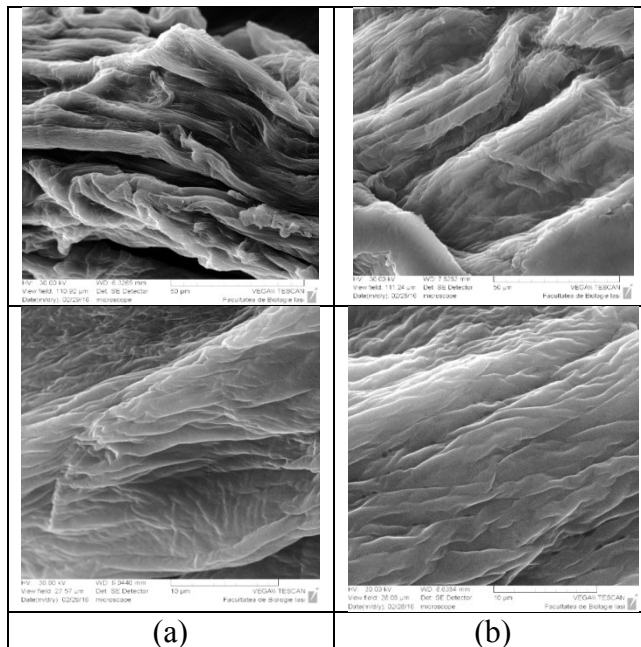


Fig. 78. Fotografii de microscopie electronică de baleiaj pentru particule conținând α -amilază imobilizată, reticulate cu (a) 1% , respectiv (b) 2% acetat de magneziu în baia de reticulare.

Morfologia particulelor în secțiune este asemănătoare, relevând formațiuni fibrilare, evident datorate gelanului. Creșterea cantității de agent de reticulare are ca efect, previzibil, creșterea gradului de reticulare, probată în fotografii de creșterea densității matricii polimerice (fig. 78, b). Rezultatul este în deplină concordanță cu modul de variație a gradului de umflare.

7.2. Capacitatea de umflare în mediu apos

Sferele de gelan obținute prin gelifiere ionotropă prezintă un evident caracter de hidrogel, astfel încât caracteristicile lor de umflare în apă sunt importante atât pentru stabilitatea lor, cât și pentru utilizarea ulterioară în procese hidrolitice repetate. O matrice de tip hidrogel permite, *a priori*, difuzia substratului în interiorul particulei pentru contactul cu enzima, dar și difuzia produșilor de hidroliză în afara matricii polimerice. În figura 79 este prezentată variația gradului de umflare pentru proba P3 obținută cu concentrații diferite în baia de gelifiere.

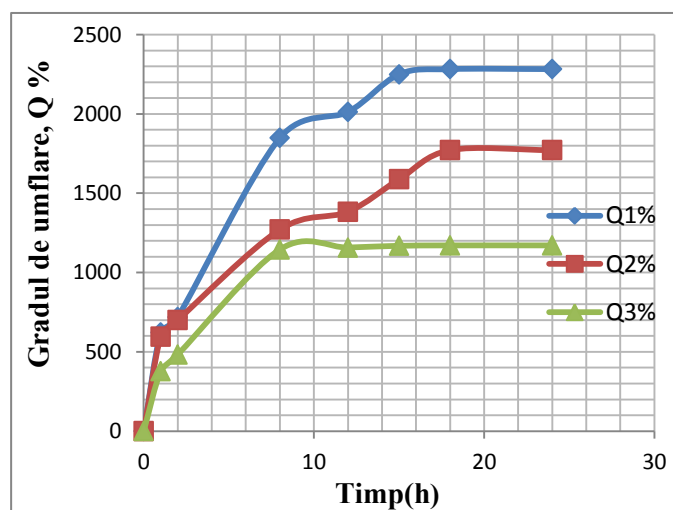


Fig. 79. Variația gradului de umflare în timp pentru trei tipuri de particule cu α -amilază imobilizată, obținute cu diferite concentrații de acetat de magneziu în baia de reticulare (concentrații de 1%, 2% și 3% acetat de magneziu)

Se constată că proba cea mai reticulată (3 % acetat de magneziu) prezintă valorile cele mai coborâte ale gradului de umflare, efectul fiind determinat de gradul lor mai ridicat de reticulare. Gradul de umflare din particule crește cu scăderea gradului de reticulare.

7.3. Caracterizarea enzimei libere

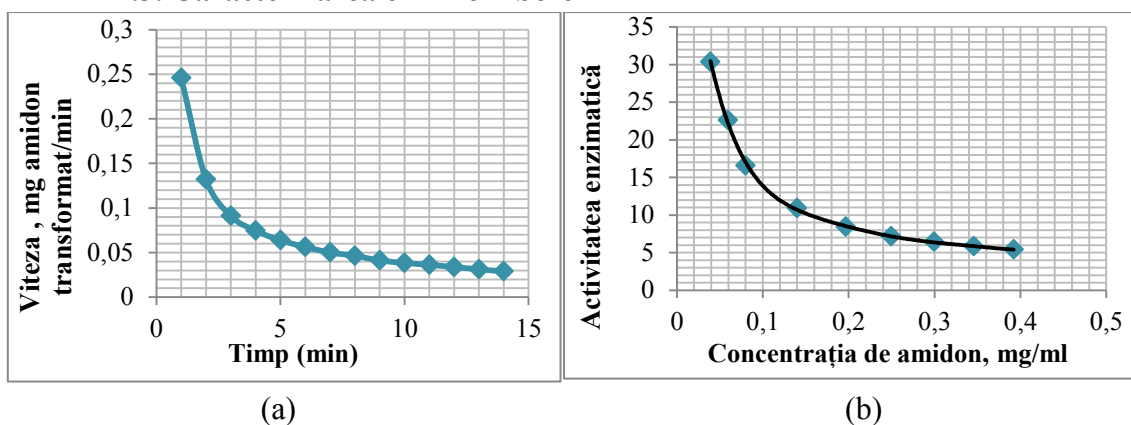


Fig. 80. Variația în timp a vitezei de hidroliză a amidonului (a) și a activității enzimatice a α -amilazei libere

Testele pe enzima liberă au fost efectuate pentru a determina activitatea enzimatică în funcție de concentrația de amidon. În figura 80 sunt prezentate variația vitezei de hidroliză a amidonului și a activității enzimatice a α -amilazei.

Se poate constata din figura 80 (a) că viteza de transformare a amidonului în zaharuri scade în timp după, iar 10 minute rămâne aproape constantă. Din acest motiv timpul necesar pentru fiecare ciclu de hidroliză a fost stabilit ca fiind de 10 minute. Din figura 80(b) se constată că activitatea enzimatică scade cu creșterea concentrației de amidon în mediul de hidroliză.

7.2.Determinarea constantei Michaelis-Menten și a vitezei maxime de hidroliză

În fig. 81 este prezentată cinetica Michaelis Menten pentru α -amilaza liberă și pentru α -amilaza imobilizată în particule de gelan reticulate ionic iar valorile constantei K_m și vitezei maxime V_{max} atât pentru enzima liberă cât și imobilizată sunt redade în tabelul 4.

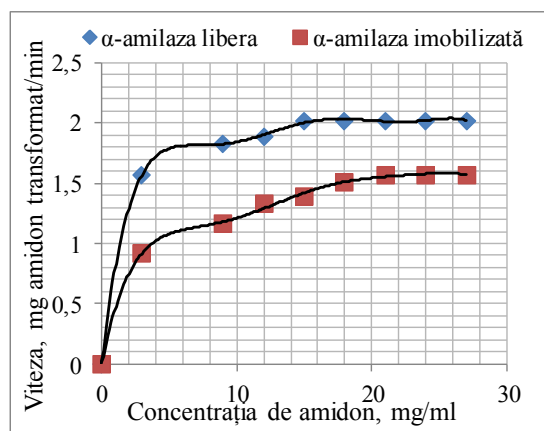


Figura 81. Cinetica Michaelis-Menten pentru enzima liberă și enzima imobilizată în particule de gelan reticulate cu acetat de magneziu

Tabel 42. Valorile constantei K_m și vitezei maxime V_{max} pentru enzima liberă și imobilizată.

Proba	Temperatura, T°C	PH	K_m , mg/ml	V_{max} , mg glucoză/min
α -Amilaza liberă	60	5.6	1.003	2.02
α -Amilaza imobilizată			2.45	1.57

Valoarea constantei K_m arată afinitatea enzimei pentru substrat. O valoare mare a constantei K_m sugerează o afinitate mai mică a enzimei pentru substrat. În general, valoarea vitezei maxime este mai mare pentru enzima liberă față de cea imobilizată, iar constanta K_m este mai mică la enzima liberă față de cea imobilizată. În cazul enzimei imobilizate se observă o scădere a afinității pentru substrat (amidon) ce poate fi cauzată de schimbările structurale ale enzimei care au loc în timpul imobilizării, apariția unor fenomene de împiedicare sterică datorate suportului utilizat și a efectelor provocate de o difuzie mai lentă.

7.2.Influența pH-ului și a temperaturii asupra activității enzimei libere și imobilizate

Determinările s-au efectuat în scopul stabilirii valorii optime a celor doi parametri, care asigură o activitate enzimatică maximă. Cantitatea de α -amilază liberă a fost aceeași cu cea imobilizată în particule în toate determinările efectuate. În figura 82 este prezentată influența pH-ului și a temperaturii asupra activității enzimatice.

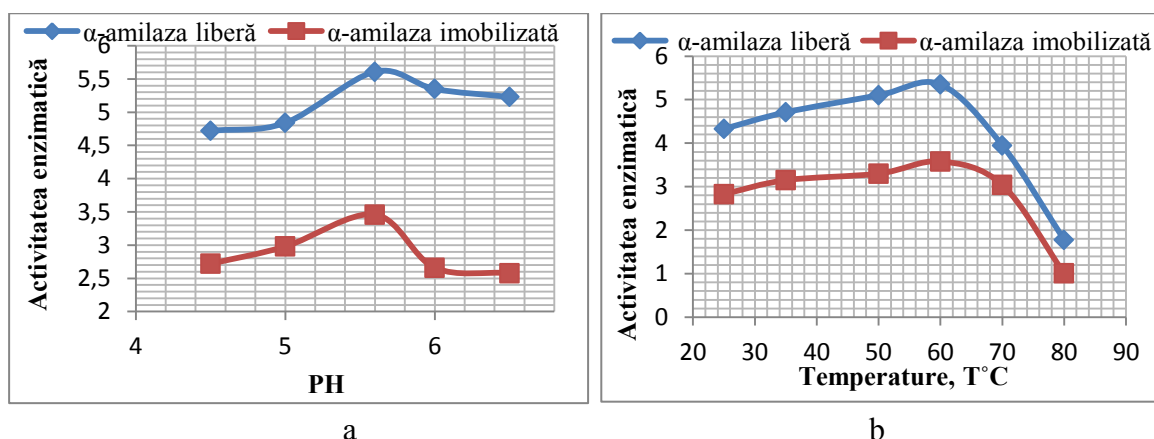


Fig. 82. Influența pH-ului (a) și a temperaturii (b) asupra activității enzimice pentru enzima liberă și imobilizată

Determinările s-au efectuat atât pentru enzima liberă cât și pentru cea imobilizată. Enzima liberă are o activitate enzimatică mai ridicată decât cea imobilizată, după cum s-a constatat și din evaluarea constantei K_m , dar în ambele cazuri se observă că valoarea maximă activității enzimatică a fost atinsă la pH 5,6 (fig. 82). În cazul ambelor forme de prezentare ale enzimei însă, optimul de activitate este atins la temperatura de 60°C.

7.2. Testarea activității enzimice a enzimei imobilizate în mai multe cicluri hidrolitice

Particulele cu α -amilază imobilizată au fost testate în mai multe cicluri de hidroliză repetate pentru a verifica dacă imobilizatele de acest tip pot fi reutilizate, fără o pierdere esențială a activității. Proba selectată pentru testarea activității enzimice în mai multe cicluri hidrolitice a fost P3. În figura 83 sunt prezentate rezultatele obținute în urma hidrolizei repetate cu acest imobilizat.

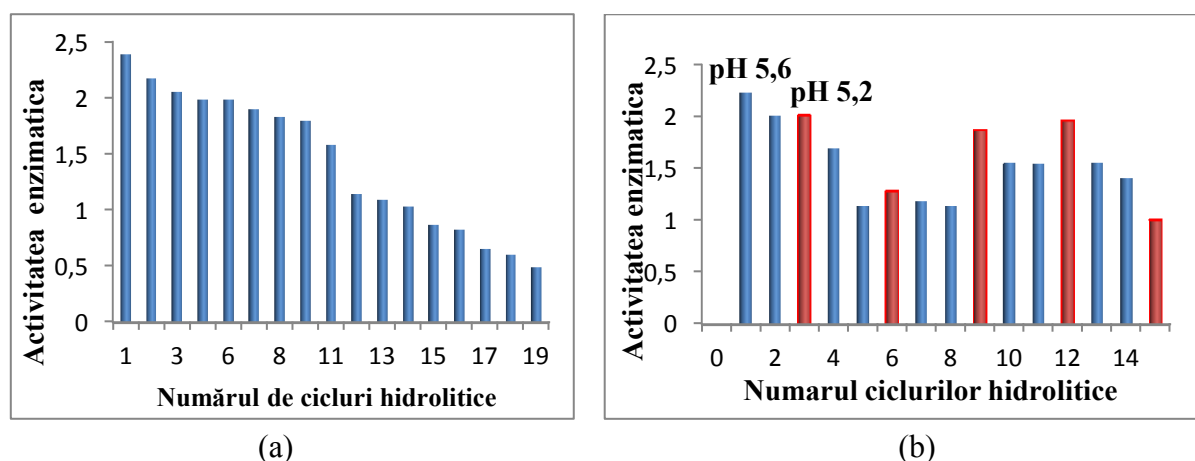


Fig. 83. Testarea activității enzimice în cicluri hidrolitice repetate pentru particule cu α -amilază imobilizată (3 mg/ml), utilizând ca substrat amidonul la (a) pH 5.6 și (b) pH 5.2 și pH 5.6.

În figura 83(a) sunt prezentate rezultatele obținute în urma testării activității enzimice a particulelor cu enzimă imobilizată, în mai multe cicluri hidrolitice. Se constată că α -amilaza imobilizată în particule își păstrează activitatea enzimatică după mai multe cicluri hidrolitice, aceasta nesuferind o diminuare importantă până la ciclul 11, după care începe să scadă.

Pentru a stabili dacă activitatea enzimei nu poate fi adusă în apropierea valorii inițiale, s-a realizat un test constând în tratarea imobilizatului cu o soluție mai acidă decât cea la care se manifestă activitate maximă. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 83 (b). Se poate observa că activitatea enzimatică crește după fiecare ciclu de hidroliză catalizat de particulele ce au fost păstrate în soluția tampon acetat cu un pH de 5,2.

Capitolul 8

Imobilizarea curcuminei în particule pe bază de polizaharide complexate polielectrolitic și reticulate ionic cu acetat de magneziu

Cercetările raportate în acest capitol au ca scop realizarea unor noi formulări prin imobilizarea curcuminei în particule de polizaharide pentru a-i crește solubilitatea și biodisponibilitatea.

Imobilizarea curcuminei a fost realizată în două tipuri de particule pe bază de complecși polielectrolitici între polizaharide cu caracter ionic diferit. S-a evaluat capacitatea particulelor de a se umfla în medii diferite și caracteristicile lor morfologice. Cinetica de eliberare a curcuminei a fost studiată în două medii de pH diferit, simulând mediile fiziologice: soluție tampon fosfat la pH 7,4 și o soluție ce simulează fluidul gastric la pH 2.

Primul tip de particule, pe bază de gelan, respectiv amestec de gelan cu caragenan, au fost obținute în două etape conform procedurii descris în capitolul 5.

Schematic, structura particulelor este prezentată în fig. 84

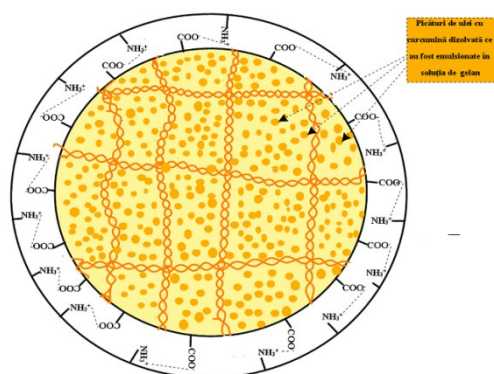


Fig.84. Structura particulelor de polizaharide cu curcumină imobilizată obținute prin metoda emulsionării și a complexării polielectrolitice

Al doilea tip de imobilizat este constituit din microparticule de chitosan în care a fost inclusă curcumina dizolvată în etanol (procedeu descris în capitolul 5).

Particulele formate sunt sferice, stabile și au diametrul mediu de 3 mm când sunt umflate, respectiv 0,5 mm când sunt uscate. Schematic, aceste particule sunt prezentate în fig. 85.

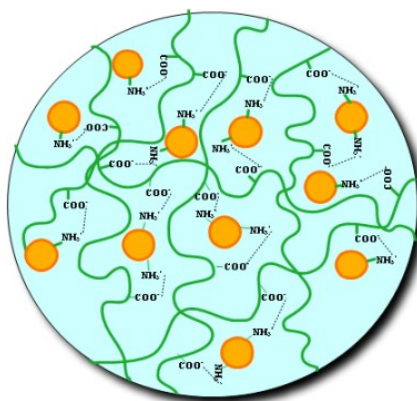


Fig.85. Prezentarea schematică a particulelor de gelan ce conțin microparticule de chitosan cu curcumină imobilizată.

Tabel 43. Programul experimental pentru obținerea particulelor și eficiența de imobilizare pentru fiecare tip de particule.

Proba	Gelan (%)	i-Caragenan (%)	Chitosan (%)	Concentrația soluției de acetat de magneziu (%)	Eficacitatea imobilizării (%)
P1*	100	0	-	2	70.0
P2*	70	30	-	2	67.42
P3**	89	-	11	1	82.94
P4**				2	87.0
P5**				3	87.16

*Extruderea emulsiei de polimer care conține curcumină a fost realizată într-un amestec compus din 60 ml soluție 1% chitosan și 20 ml soluție acetat de magneziu de concentrație 2 %.

**Particulele au în compoziție 89% gelan și 11% chitosan; volumul soluției de acetat de magneziu : 100 ml

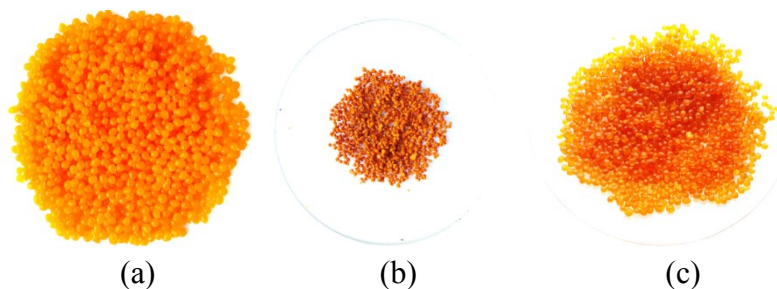


Fig. 86. Particule cu curcumină imobilizată: (a) proba P3 cu particule umflate, (b) proba P3 particule uscate și (c) proba P1 particule uscate.

8.1. Morfologia particulelor

Pentru evaluarea morfologiei particulelor s-a procedat la analiza secțiunilor acestora prin microscopie electronică de baleiaj. Probele alese pentru această analiză au fost P1, P2 și P3, fotografiile obținute fiind prezentate în fig. 87

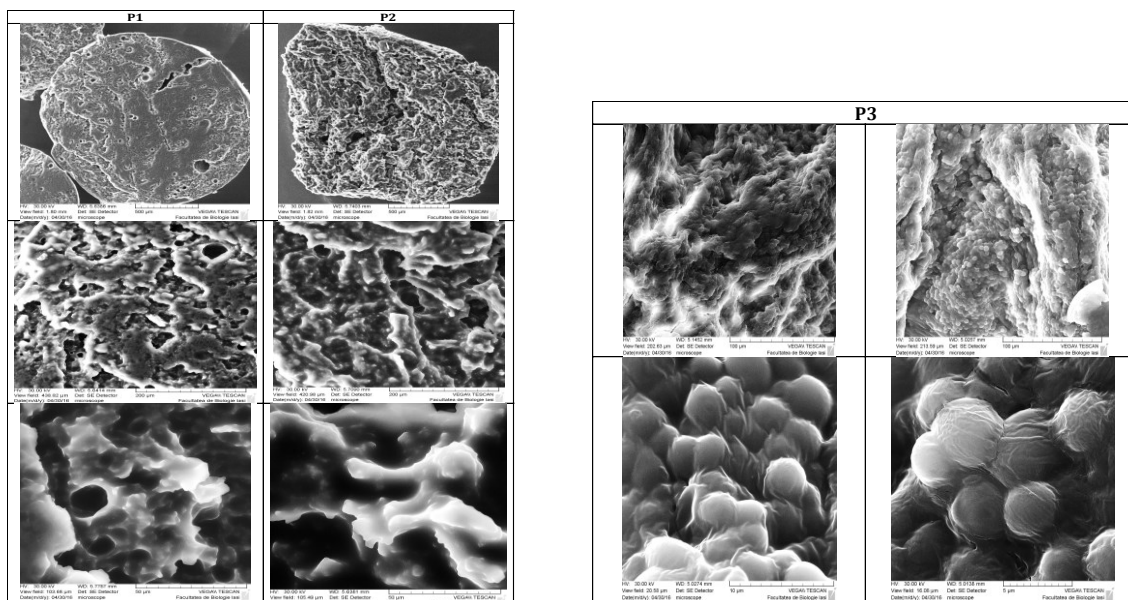


Fig.87. Fotografii obținute prin microscopie electronică de baleiaj în secțiune, pentru particule conținând curcumină imobilizată.

Particulele P1 și P2 prezintă o morfologie poroasă, mult accentuată la proba P2, care conține și i-caragenan. Pentru proba P3 se observă că microparticulele de chitosan ce conțin curcumină, în număr mare, sunt bine prinse în rețeaua polimeră a matricii de gelan. Diametrul lor este de aproximativ 2-3 μm .

8.2.Capacitatea de umflare

Capacitatea particulelor de a se umfla în medii diferite a fost evaluată prin măsurarea gradului de umflare. Acesta a fost determinat gravimetric pentru probele P3, P4 și P5 în soluție tampon fosfat pH = 7.4 precum și în soluție ce simulează fluidul gastric intestinal la pH 2. Probele diferă prin cantitatea de agent de reticulare din baia de gelifiere.

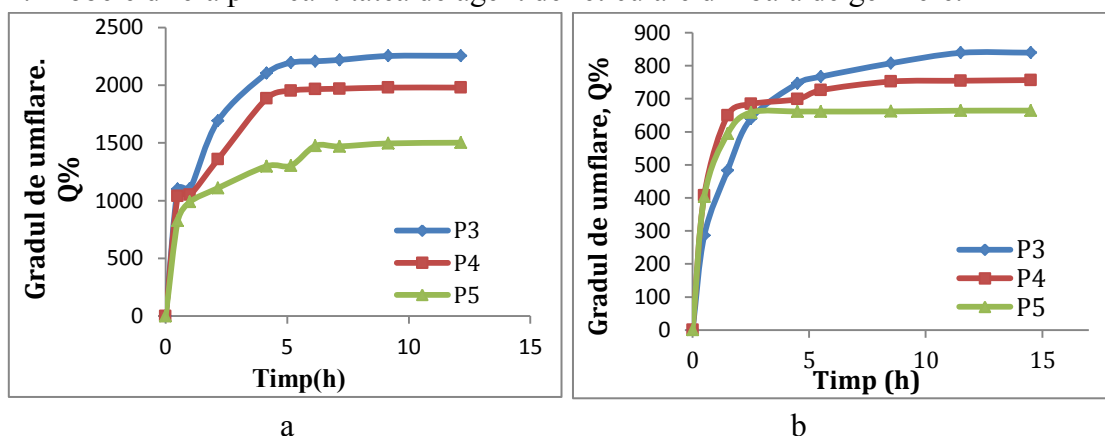


Fig.88. Variația în timp a gradului de umflare pentru probele P3, P4 și P5. (a) soluție tampon fosfat pH = 7,4 ; (b) soluție care simulează lichidul gastric pH = 2.

O primă constatare este faptul că valoarea gradului de umflare este mai ridicată în mediu ușor bazic (fig. 88 a). Explicația este legată de faptul că particulele prezintă gelan în stratul exterior, pH-ul bazic având ca efect formarea de anioni carboxilat din grupele acide care nu au participat la reticularea cu ioni de Mg^{2+} . Apar astfel respingeri electrostatice între

macromoleculele de polizaharid, care determină relaxarea rețelei și facilitează pătrunderea unor cantități mai mari de apă. Concluzii similare sunt raportate în literatură [555].

La $\text{pH} = 2$, gradul de umflare mai mic poate fi explicat ca fiind o consecință a formării legăturilor de hidrogen între grupele carboxilice și grupările $-\text{OH}$ din polizaharide, efect raportat anterior și de către alți cercetători [444, 555].

Indiferent de mediul de umflare folosit, gradul de umflare crește cu reducerea gradului de reticulare, respectiv a cantității de reticulant ionic folosit.

8.3. Cinetica de eliberare a curcuminei din particule

Cinetica de eliberare a curcuminei a fost studiată, de asemenea, în două medii diferite de pH : soluție tampon fosfat $\text{pH} = 7,4$ și soluție care simulează fluidul gastric la $\text{pH} = 2$, la temperatura fiziologică ($T=37^\circ\text{C}$), până la echilibru. În figura 89 sunt prezentate curbele de eliberare pentru probele analizate.

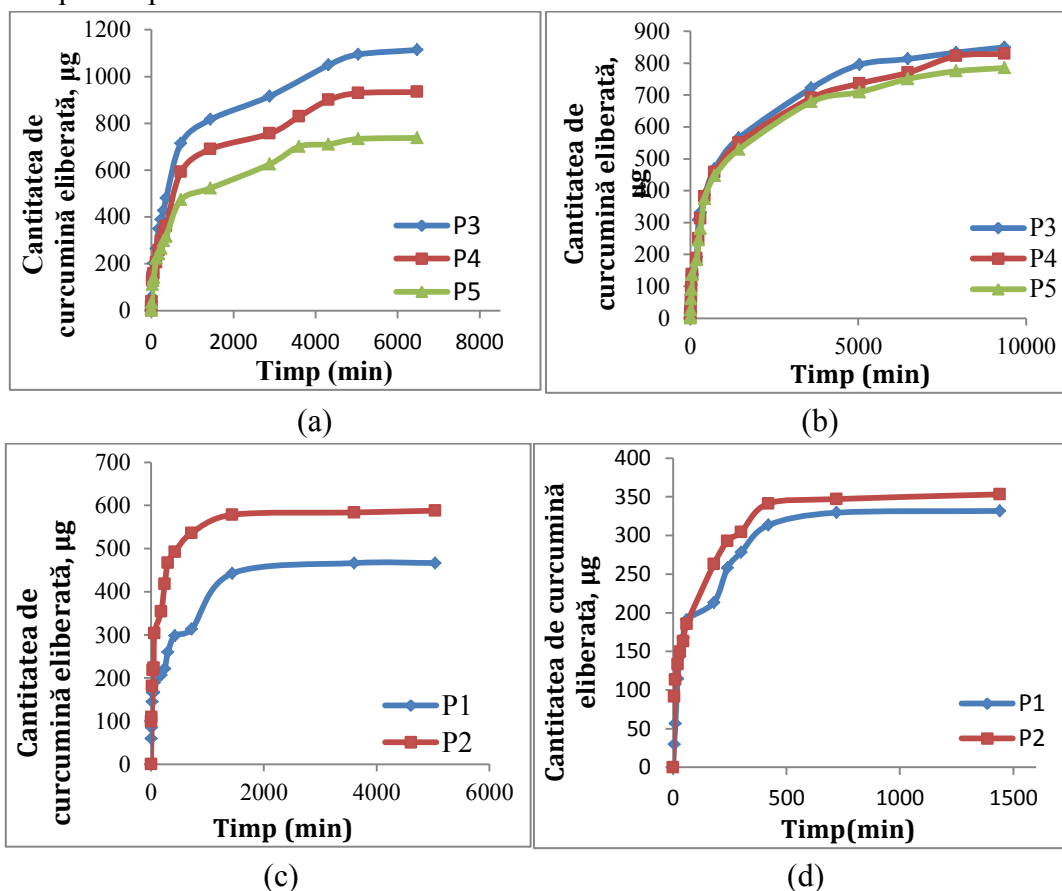


Fig.89. Cinetica eliberării curcuminei din diferite particule: (a) P3, P4, P5 în soluție tampon fosfat $\text{pH}=7,4$; (b) P3, P4, P5 în soluție $\text{pH}=2$; (c) P1, P2 în soluție tampon fosfat $\text{pH}= 7.4$, (c) P1, P2 în soluție $\text{pH} 2$.

Cantitatea maximă de curcumină eliberată indiferent de probă (respectiv eficiența de eliberare – tabel 44) este mai mare în soluția tampon fosfat la $\text{pH} = 7,4$ decât în cea care simulează fluidul gastric la ($\text{pH}= 2$).

Tabel 44. Eficiența de eliberare a curcuminei
în medii cu pH diferit

Proba	Eficiența de eliberare a curcuminei din particule, %	
	pH 7.4	pH 2
P1	68	60.47
P2	73.96	69.75
P3	83.81	64.72
P4	69.17	61.41
P5	58.62	55.32

Eficiența de eliberare crește cu scăderea gradului de reticulare la particulele de gelan ce conțin microparticule de chitosan cu curcumină imobilizată indiferent de pH-ul mediului în care a avut loc eliberarea.

Comparând probele P1 și P2, se constată creșterea cantității de curcumină eliberată atunci când în compoziția amestecului de polimeri este și o cantitate de i-caragenan, în concluzie crește cu creșterea porozității din particule.

Eficiența de eliberare mai ridicată în mediu bazic, pentru toate probele analizate, este, de asemenea, consecința unei umflări mai intense a matricii care permite creșterea ochiurilor rețelei și, deci, difuzia facilitată a principiului activ.

În cazul P3, P4, P5 eliberarea curcuminei se efectuează cu o viteză mai mare până la 720 min după care cantitatea de curcumină eliberată în timp începe să scadă până la un punct de echilibru la aproximativ 5000 min când cantitatea de curcumină eliberată rămâne constantă atât la pH = 7.4 cât și la pH = 2.

În cazul particulelor P1 și P2 la pH = 7.4 cantitatea de curcumină eliberată crește constant până la 1440 minute după care particulele nu mai eliberează. La pH = 2 particulele eliberează curcumină până la 420 minute după care cantitatea de curcumină rămâne constantă.

Este important de subliniat faptul că cea mai mare parte din curcumina imobilizată în particule este eliberată în primele 12-15 ore, timp apropiat de cel de staționare a alimentelor în tractul digestiv, ceea ce permite acumularea treptată a, practic, întregii cantități de compus biologic activ în organism.

CONCLUZII GENERALE

Cercetările efectuate în cadrul lucrării de doctorat au abordat un domeniu foarte actual și de mare interes pentru aplicații în industria alimentară, ce pot fi extinse și la alte industrii care apelează la biotehnologii.

Scopul lucrării l-a constituit obținerea unor noi sisteme formate din compuși biologic activi de interes pentru aplicații în industria alimentară, imobilizați în matrici sferice cu caracter de hidrogel pe bază de polizaharide reticulate ionice.

S-au conturat trei direcții de cercetare, determinate de natura compusului biologic activ imobilizat:

- obținerea de bioreactoare pentru fermentarea glucozei
- obținerea de bioreactoare pentru hidroliza amidonului
- obținerea de nutraceutice.

La finalul fiecărui capitol care raportează rezultatele cercetărilor obținute în cadrul celor trei direcții au fost prezentate concluziile rezultate în urma studiului. Acestea au permis stabilirea concluziilor generale ce vor fi prezentate în cele ce urmează.

1. Polizaharidele ionice constituie candidați ideali pentru obținerea de imobilizate ale celulelor de drojdie de bere, α -amilazei și curcuminei, sub formă de particule cu caracter de hidrogel, printr-un procedeu simplu de gelifiere ionotropă cu ioni metalici divalenți, utilizând tehnica extruderii prin capilară.

2. Gelanul - folosit ca materie primă de bază pentru obținerea imobilizatelor în toate cercetările întreprinse în cadrul tezei -, folosit singur constituie o matrice convenabilă, ușor de reticulat cu ioni de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} conducând la particule stabile în medii apoase sau alcoolice, astfel încât pot fi utilizate într-un număr ridicat de cicluri de fermentare.

3. Stabilitatea particulelor de gelan gelifiat ionotrop depinde de natura reticulantului, cantitatea de agent de reticulare din soluția de prereticulare precum și din baia de gelifiere (coagulare).

4. Ionul Mg^{2+} din acetatul de magneziu furnizează structuri mai stabile din punct de vedere mecanic în condițiile păstrării unei viabilități celulare ridicate. Ionul de Zn^{2+} permite obținerea de performanțe în reticulare comparabile cu ionii Ca^{2+} și Mg^{2+} , în condițiile utilizării unor cantități cu un ordin de mărime mai coborâte ca aceștia, determinată de capacitatea sa de a participa la reticulare și prin legături coordinative cu polizaharidul.

5. Stabilitatea structurală a particulelor, caracteristicile lor morfologice, caracteristicile de umflare în medii apoase și în final și performanțele în procese de fermentare sunt influențate de cantitatea de agent de reticulare utilizat atât în faza de pre-reticulare cât mai ales în cea de gelifiere ionotropă. Cantități mai mari de agent de reticulare măresc stabilitatea structurală, reduc gradul de umflare în apă prin creșterea densității de reticulare, reduc ușor randamentul în fermentare al imobilizatelor deoarece determină o difuzie mai lentă a substratului către celulele imobilizate.

6. Particulele suport, fără principiul activ imobilizat, prezintă o structură mai poroasă, care devine mai densă în prezența celulelor de drojdie, capabile de a participa ele însele la legături ionice cu matricea și determinând astfel o reticulare mai avansată. Aceste legături pot explica, de asemenea, ancorarea puternică a celulelor de drojdie în matricea polimeră responsabilă de faptul că doar o mică parte din acestea difuzează în mediul în care sunt suspendate particulele.

7. Stabilitatea imobilizatelor este ridicată, indiferent de agentul de reticulare utilizat, fapt atestat de valoarea ridicată a transmitanței mediilor apoase în care sunt suspendate, precum și de testele reologice efectuate. Această proprietate se păstrează la valori practic nemodificate în timp.

8. Bioreactoarele pe bază de gelan reticulat cu cele trei tipuri de cationi metalici manifestă o capacitate ridicată de fermentare a glucozei, superioară chiar utilizării drojdiei libere.

9. Gelanul poate fi utilizat în amestec cu carboximetil celuloza pentru formarea de particule prin același procedeu, rezultând structuri interconectate/interpenetrante stabile. Prezența unui număr mai ridicat de grupe reticulabile în carboximetil celuloză constituie un avantaj, deoarece permite substituirea unei cantități ridicate de gelan cu un derivat celulozic mai ieftin.

10. Raportul de combinare a gelanului cu carboximetil celuloza constituie un factor ce influențează densitatea de reticulare a matricei, și de aici caracteristicile morfologice, stabilitatea, comportamentul la umflare în medii apoase, capacitatea de fermentare a imobilizatorilor.

11. Amestecuri din trei polizaharide – gelan, carboximetil celuloză sare de sodiu și caragenan -, în diferite proporții pot fi reticulate cu cei trei cationi metalici, caracteristicile lor morfologice, structurale și fizico-chimice fiind influențate de raportul polimerilor și de natura ionului reticulant. Matricile rezultate prezintă o structură complexă, fiind de tip interconectat/interpenetrat.

12. Prezența caragenanului în compoziția particulelor are ca efect creșterea porozității acestora cu efecte benefice asupra capacității de difuzie a substratului în miezul matricei, ce determină final capacitatea de fermentare produsă de acestea.

13. Utilizarea Mg^{2+} și a Zn^{2+} ca agenți de reticulare este avantajoasă nu numai prin caracteristicile pe care le imprimă particulelor, ci și din punct de vedere al beneficiilor aduse de acești ioni asupra celulelor de drojdie de bere imobilizate: creșterea viabilității și a capacității de proliferare.

14. Metabolizii din mediul de fermentare, cu caracter toxic, nu au un efect pronunțat asupra celulelor de drojdie incluse în matricea polimeră; indiferent de compoziția sa, aceasta păstrează viabilitatea celulară la valori optime în timp.

15. pH-ul mediului de fermentare și durata de păstrare a imobilizatorilor în baia de reticulare influențează activitatea bioreactoarelor, indiferent de compoziția lor; valoarea optimă a pH-ului în soluția de glucoză supusă fermentării este 5, în concordanță cu rezultate stabilite în alte cercetări, iar timpul optim de păstrare în baia de reticulare este de 2 ore.

16. Toate imobilizatele păstrează stabilitate structurală/mecanică ridicată în soluții apoase de alcool etilic, caracteristică importantă pentru posibilitatea reutilizării lor în cicluri repetate de fermentare.

17. Fermentarea se produce dominant în particulele purtătoare de celule de drojdie de bere, și nu în mediul lichid din baia de fermentare, în care se găsește un număr foarte redus de celule de drojdie libere.

18. Celulele de drojdie de bere proliferază în matricea polimeră, indiferent de natura sa. În matricea polimeră se găsesc în cea mai mare proporție celule vii, dovadă fiind viabilitatea celulară care se păstrează la valori foarte ridicate, de minim 82 %, chiar după un număr mare de cicluri de fermentare.

19. Bioreactoarele obținute pot fi recuperate cu ușurință din mediul de fermentare și reutilizate în alt ciclu fermentativ după o durată scurtă de păstrare în apă distilată. În funcție de natura reticulantului și a matricel polimere, se poate ajunge până la 40 de cicluri fermentative, cu randamente permanent superioare celui atins cu celule de drojdie libere.

20. Particulele cu drojdie de bere imobilizată în matrici polizaharidice (simple sau în amestec) reticulate ionic pot reprezenta o nouă abordare în producerea alcoolului etilic de uz alimentar sau pentru carburanți (biodiesel) datorită avantajelor pe care le manifestă: ușurință în obținere, folosirea pentru generarea matricii a unor polizaharide ieftine, din surse regenerabile, utilizarea de agenți de reticulare ieftini, consum redus de biocatalizator (drojdie de bere) datorită posibilității de utilizare repetată un număr mare de cicluri fermentative, recuperare facilă din mediul de fermentare, potențiala rezolvare a deficitului de ioni metalici importanți pentru proliferarea și viabilitatea celulelor de drojdie – problemă cu care se

confruntă producătorii din industria băuturilor alcoolice -, posibilitatea trecerii la procese de fermentare continui cu avantajele binecunoscute. O potențială utilizare o poate constitui șampanizarea vinurilor, industrie în care în prezent se utilizează imobilizate pe bază de alginat, mai puțin stabile structural.

21. Gelanul constituie o matrice adecvată pentru imobilizarea α -amilazei, în scopul obținerii de particule prin gelifiere ionotropă cu ioni de Mg^{2+} , potențial utilizabile în procese repetate de hidroliză a amidonului.

22. Morfologia și proprietățile de umflare în medii apoase ale particulelor sunt și în acest caz influențate de cantitatea de reticulant. Particulele prezintă în structură o morfologie fibrilară, tot mai densă cu creșterea cantității de reticulant, cu capacitate de umflare în apă ce diminuează cu acest parametru.

23. Particulele de imobilizat manifestă o activitate biocatalitică maximă la temperatura de 60°C și pH= 5,6, la fel ca și enzima liberă, ceea ce atestă faptul că prin imobilizarea enzima nu este denaturată.

24. Valoarea mai ridicată a constantei Michaelis-Menten pentru enzima imobilizată atestă, după cum era de așteptat, o afinitate ușor mai redusă a acesteia pentru substrat (amidon), determinată și de gradele mai mici de libertate ale enzimei, și de factori sterici.

25. Imobilizatele de α -amilază imobilizată pot fi ușor recuperate din mediul de hidroliză, având capacitatea de reutilizare până la 11 cicluri hidrolitice repetate fără scăderea activității enzimatică; activitatea enzimatică se reduce apoi treptat până la cel de al 19-lea ciclu.

26. Activitatea enzimatică a imobilizatelor poate fi readusă aproape de valoarea inițială prin regenerare într-un mediu mai acid.

27. Imobilizatele de α -amilază în matrici reticulate ionic pe bază de gelan deschid perspectiva utilizării în procese hidrolitice continui, cu toate avantajele ce decurg din acestea.

28. Polizaharidele ionice constituie candidați importanți la realizarea de matrici pentru imobilizarea curcuminei, conducând la noi formulări nutraceutice.

29. Complexarea polielectrolitică a unor perechi de polizaharide cu caracter ionic diferit – gelan și chitosan – completată de gelifierea ionotropă cu ioni metalici divalenți, realizată prin două tehnici diferite, permite obținerea de particule capabilă să încorporeze curcumina.

30. Particulele de imobilizat prezintă morfologii diferite funcție de modul de obținere: fie de tip ”miez-manta” când miezul este format din gelan gelifiat ionotrop, conținând curcumină, complexat ulterior polielectrolitic cu chitosan, fie de tip microparticule de chitosan conținând curcumină, dispersate într-o matrice de gelan gelifiat ionotrop cu care formează complexul polielectrolitic.

30. Eficiența de imobilizare a curcuminei crește dacă aceasta este dizolvată inițial în alcool etilic ce este ulterior îndepărtat prin evaporare; creșterea gradului de reticulare a matricii determină creșterea cantității de curcumină incapsulată.

31. Caracteristicile de umflare în apă și cantitatea de curcumina eliberată în medii de pH diferit se îmbunătățesc prin reducerea gradului de reticulare a matricii de gelan.

32. Utilizarea caragenanului în amestec cu gelanul determină o morfologie diferită, caracterizată prin porozitate accentuată, ceea ce are ca efect intensificarea difuziei curcuminei în procesul de eliberare.

33. Profilul de eliberare a curcuminei este specific celor două tipuri de imobilizate obținute, atât în mediu acid simulând pH-ul gastric (acid) cât și cel intestinal (bazic), procesul decurgând cu eficiență mai ridicată în cel din urmă.

Bibliografie selectiva:

- [22] G.M. Walker, R. De Nicola, S. Anthony, R. Learmonth, "Yeast-metal interactions: impact on brewing and distilling fermentations", In: *Inst.Brew. Dist., Asia Pac. Sec. Conv.*, pp. 19-24, 2006.
- [28] H. O. Udeh, T. E. Kgatla, A. I. O. Jideani, "Effect of Mineral Ion Addition on Yeast Performance during Very High Gravity Wort Fermentation", *Int J Biol, Biomol, Agric, Food Biotechnol Eng* Vol:8, No:11, 2014.
- [29] R. J. Elin, "Magnesium: The Fifth but Forgotten Electrolyte," *Am J Clin Pathol*, vol. 102, no. 5, pp. 616–622, 1994.
- [30] A. Hartwig, "Role of magnesium in genomic stability," *Mutat Res Fundam Mol Mech M utagen*, vol. 475, no. 1–2, pp. 113–121, 2001.
- [31] O. Udeh, T.E Kgatla, "Role of magnesium ions on yeast performance during very high gravity fermentation," *J. Brew. Distil.*, vol. 4, no. 2, pp. 19–45, 2013.
- [33] J. Bose, O. Babourina, Z. Rengel, "Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants," *J. Exp. Bot.*, vol. 62, no. 7, pp. 2251–2264, 2011.
- [48] E. M. R. Rees, G. G. Stewart, "Effects of Magnesium, Calcium and Wort Oxygenation on the Fermentative Performance of Ale and Lager Strains Fermenting Normal and High Gravity Worts*," *J I Brewing*, vol. 105, no. 4, pp. 211–218, 1999.
- [51] H. Densky, P.J. Gray, A. Buday, "Further studies on the determination of zinc and its effects on various yeasts", *Proceedings of the American Society of Brewing Chemists*, pp. 93-94, 1996.
- [57] V. Stehlik-Tomas, "Zinc, Copper and Manganese Enrichment in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 42, no. 2, pp. 115-120, 2004
- [332] S. M. Tan, P. W. S. Heng, L. W. Chan, "Development of Re-Usable Yeast-Gellan Gum Micro-Bioreactors for Potential Application in Continuous Fermentation to Produce Bio-Ethanol," *Pharmaceutics*, vol. 3, no. 4, pp. 731–744, 2011.
- [563] T. Tuszynski, A. Pasternakiewicz, "Interaction of metal ions on the yeast growth *Saccharomyces cerevisiae* in depending of medium pH", *Chem. Inz. Ekol.* vol. 6, no 5-6, pp. 720-728, 1999

Valorificarea rezultatelor

Participarea la manifestări științifice

Comunicări :

1. Camelia Iurciuc (Tincu), Alexandru Savin, Marcel Popa, Patrick Martin, Immobilisation de la levure de biere dans de particules a base gellane pour applications en cycles repetes de fermentation, la al XI-lea Simpozion Franco-Român de Polimeri, Pitești, România, 27 - 29 august 2014.
2. Alexandru Savin, Camelia Iurciuc (Tincu), Marcel Popa, Patrick Martin, Biopolymer – Yeast Particulated System, 2nd International Conference on Bioinspired and Biobased Chemistry & Materials, N.I.C.E., The French Riviera, France, October 15-17, 2014
3. Camelia Iurciuc (Tincu), Alexandru Savin, Marcel Popa, Patrick Martin, Immobilized brewers yeast in ionic cross-linked gellan particles: preparation, characterization and applications, 3rd North and East European Congress on Food, Brasov, Romania 20-23 May 2015
4. Camelia Iurciuc (Tincu), Alexandru Savin, Marcel Popa, Patrick Martin, Gellan/carboxymethyl cellulose based hydrogels in the particulated form for yeast cells immobilisation, 19th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Sibiu, România, 2-5 septembrie 2015.
5. Camelia Iurciuc (Tincu), Patrick Martin, Marcel Popa, The α -Amylase immobilization in gellan particles ionic crosslinked with magnesium acetate solution, XIIth Franco-Romanian Symposium on Polymers, 5-7 septembrie 2016, Sophia Antipolis, France
6. Camelia Iurciuc (Tincu), Patrick Martin, Marcel Popa, α -Amilază imobilizată în particule de gelan obținute prin gelifiere ionotropă cu ioni de magneziu, Sesiunea Științifică de Toamnă, Neamț „ Știință. Cunoaștere. Creativitate. Spiritualitate” , 22-24 septembrie 2016, Durău.
7. Camelia Iurciuc (Tincu), Marcel Popa, Efectele terapeutice ale curcuminei și beneficiile obținute prin imobilizare în matrici polimere pe bază de polizaharide, Conferința Internațională de Terapii Alternative ” Anatecor”, Arad, România, 2-4 Decembrie 2016

Postere:

1. Camelia Iurciuc (Tincu), Corina.Lenuta Savin, Alexandru Savin, Marcel Popa, Patrick Martin, Yeast cells immobilized in spherical gellan matrices: a comparative study, International Conference on Materials Science & Engineering, Brașov, Romania, 5-7 martie 2015
2. Catalina Anisoara Peptu, Corina Lenuta. Savin, Gabriela Andrei, Camelia Elena Iurciuc (Tincu), Marcel Popa, Poly (ethylene methacrylate) grafted chitosan microparticles for ophthalmic applications, International Conference on Materials Science & Engineering, Brașov, Romania, 5-7 martie 2015.

3. Camelia Iurciuc (Tincu), Alexandru Savin, Marcel Popa, Patrick Martin, Hybrid particles based on polysaccharides and beer yeast used in continuous fermentation, 7th National Congress with International Participation and 33rd Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology, Baia Mare, România, 11-14 iunie 2015-Premiul II.
4. Camelia Iurciuc (Tincu), Alexandru Savin, Patrick Martin, Popa Marcel, Hydrogel particles based on polysaccharides mixtures for yeast cells immobilization 2nd CommScie International Conference "Challenges for Sciences and Society in Digital Era", Iasi, Romania, 4-5 decembrie 2015
5. Camelia Iurciuc (Tincu), Catalina Anisoara Peptu, Patrick Martin, Marcel Popa, „Imobilizate de α -Amilază în matrici de gelan reticulat ionic”, Congresul Internațional al Universității Apollonia, 3-5 martie 2016, Iași- Premiul III.
6. C.V. Andrițoiu, C. Iurciuc (Tincu), Catalina Anisoara Peptu, Corina Lenuta. Savin, Marcel Popa, Noi formulări pe bază de polimeri naturali și extracte api-fitoterapice pentru tratamentul unor leziuni dermice induse experimental, Congresul Internațional al Universității Apollonia, 3-5 martie 2016, Iași.
7. Camelia Iurciuc (Tincu), Patrick Martin, Vincent Sol, Marcel Popa, New supports for curcumin immobilization based on polysaccharides, XIIth Franco-Romanian Symposium on Polymers, 5-7 septembrie 2016, Sophia Antipolis, France
8. Camelia Iurciuc (Tincu), Alexandru Savin, Patrick Martin, Marcel Popa, Yeast cells immobilized in gellan particles ionically crosslinked with CaCl_2 , The 3rd International Conference on Bioinspired and Biobased Chemistry & Materials, October 16-19. 2016, Nice, France.

Lucrări publicate

1. C. Iurciuc (Tincu), A. Savin, C. Lungu, P. Martin, M. Popa, "Gellan. Food Applications", Cellulose Chem. Technol., vol. 50, no. 1, pp.1-13, 2016.
2. C. E. Iurciuc (Tincu), L. Alupei, A. Savin, C. Ibănescu, P. Martin, M. Popa, "Yeast cells immobilized in spherical gellan particles cross-linked with magnesium acetate," J. Biotechnol., vol. 236, pp. 45–56, 2016.
3. C.V. Andrițoiu, V. Andrițoiu, C. Tincu, A. Spatareanu, M. Popa "Polimeri naturali utilizati in formularile pentru tratamentul leziunilor cutanate", Jurnal de medicina integrativa si terapii complementare, 1, 1, 87-104, 2015
4. Iurciuc Camelia- Elena (Tincu), Substantele nutraceutice si alimentele functionale-o noua abordare in preventia bolilor cronice-Articol pentru popularizare, Info Apollonia-Agentie de presa, <http://www.infoapollonia.ro/sanatate/substantele-nutraceutice-si-alimentele-functionale-o-noua-abordare-in-preventia-bolilor-cronice/>

Lucrări acceptate pentru publicare:

1. Camelia Iurciuc (Tincu), Cristina Lungu, Patrick Martin, Marcel Popa, Gelan. II. Pharmaceutical, medical and cosmetic applications, Cellulose Chemistry and Technology.
2. Camelia Iurciuc (Tincu), Alexandru Savin, Patrick Martin, Catalina Anisoara Peptu, Marcel Popa, Yeast cells immobilized in ionic crosslinked hydrogel particles based on gellan and gellan/ carboxymethyl cellulose – comparative study-Journal of Hydrogel
3. Camelia Iurciuc (Tincu), Călin Vasile Andrițoiu, Marcel Popa, Rolul ionilor metalici în metabolismul celulelor de drojdie și în procesele fermentative, Jurnal de medicina integrativa și terapii complementare.

Lucrări trimise spre publicare:

1. Camelia Iurciuc (Tincu), Alexandru Savin, Marcel Popa, Patrick Martin, Microencapsulation of baker's yeast using gellan gum. Alcohol production study, European Food Research and Technology.
2. Iurciuc (Tincu) Camelia-Elena, Alexandru Savin, Leonard Ionut Atanase, Maricel Danu, Patrick Martin, Marcel Popa, Influence of some factors on the fermentative activity of the gellan particles with immobilized yeast cells and ionically cross-linked with zinc acetate, LWT-Food Science and Technology
3. Iurciuc (Tincu) Camelia-Elena, Alexandru Savin, Leonard Ionut Atanase, Patrick Martin, Marcel Popa, Immobilized yeast cells in spherical matrices based on polysaccharides mixture and obtained by ionotropic gelation. I. Preparation and physicochemical properties, Food Hydrocolloids
4. Iurciuc (Tincu) Camelia-Elena, Alexandru Savin, Leonard Ionut Atanase, Patrick Martin, Marcel Popa, Immobilized yeast cells in spherical matrices based on polysaccharides mixture and obtained by ionotropic gelation. II. Fermentative activity study Food Hydrocolloids.

Lucrări în curs de redactare:

1. Iurciuc (Tincu) Camelia-Elena, Alexandru Savin, Leonard Ionut Atanase, Patrick Martin, Marcel Popa, Imobilizarea celulelor de drojdie în suporturi pe bază de amestec de polizaharide gelan/CMCNa reticulate ionic cu acetat de magneziu. Biochemical Engineering Journal
2. Iurciuc (Tincu) Camelia-Elena, Leonard Ionut Atanase, Patrick Martin, Marcel Popa, Suporturi pe bază de polizaharide pentru imobilizarea curcuminei. Journal of Food Science.
3. Iurciuc (Tincu) Camelia-Elena, Leonard Ionut Atanase, Patrick Martin, Marcel Popa, Imobilizarea α -amilazei în suporturi de gelan, Biochemical Engineering Journal.