



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



Rezumatul Tezei de Doctorat

**Obținerea, caracterizarea și evaluarea
potențialului antimicrobian al unor compuși
bioconservanți obținuți prin biotransformarea unor
lipide din surse vegetale**

Conducător științific,

Prof. dr. ing. Gabriela BAHRIM

Doctorand,

Ing. Georgiana PARFENE

Galați, 2012



ROMÂNIA
UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS”
DIN GALAȚI



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

C 12376/22.10.2012

Către

Universitatea “ Dunărea de Jos “ din Galați vă face cunoscut că în data de 17.12.2012, ora 9.00, în sala F103 a Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată: ”OBTINEREA, CARACTERIZAREA ȘI EVALUAREA POTENTIALULUI ANTIMICROBIAN AL UNOR COMPUȘI BIOCONSERVANȚI OBTINUȚI PRIN BIOTRANSFORMAREA UNOR LIPIDE DIN SURSE VEGETALE”, elaborată de domnul/doamna PARFENE GEORGIANA, în vederea conferirii titlului științific de doctor în Domeniul de doctorat - Inginerie industrială.

Comisia de doctorat are următoarea componență :

- 1. Presedinte:** Prof.univ.dr.ing. Petru ALEXE
Universitatea “Dunărea de Jos” din Galați

- 2. Conducător de doctorat:** Prof.univ.dr.ing. Gabriela-Elena BHRIM
Universitatea “Dunărea de Jos” din Galați

- 3. Referent oficial:** Prof.univ.dr. Francisc PETER
Universitatea “POLITEHNICA” din Timișoara

- 4. Referent oficial:** Prof.univ.dr. Ștefana JURCOANE
Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din București

- 5. Referent oficial:** Prof.univ.dr. Ștefan DIMA
Universitatea “Dunărea de Jos” din Galați

Cu această ocazie vă transmitem rezumatul tezei de doctorat și vă invităm să participați la susținerea publică. În cazul în care doriți să faceți eventuale aprecieri sau observații asupra conținutului lucrării, vă rugăm să le transmiteți în scris pe adresa Universității, str. Domnească nr. 47, 800008 - Galați, Fax - 0236 / 461353.

RECTORAT
Prof.univ.dr.ing. Iulian Gabriel BÎRSAN



Mulțumiri

Mulțumirile și recunoștința mea se îndreaptă către doamna prof. dr. ing. Gabriela Bahrim, conducătorul științific, pentru profesionalismul cu care m-a ghidat pe drumul către obținerea titlului de doctor, pentru permanenta îndrumare științifică, pentru sprijinul acordat pe perioada desfășurării studiilor doctorale și a elaborării tezei.

Cu deosebit respect aș dori să le mulțumesc domnilor profesori membri ai comisiei de îndrumare a tezei de doctorat, conf. univ. dr. Rodica Dinică, conf. dr. ing. chim. Ștefan Dima, conf. univ. dr. Luminița Georgescu, pentru permanentele încurajări și pentru aprecierile, observațiile, sugestiile și recomandările formulate pe parcursul elaborării lucrării.

Doresc să mulțumesc doamnei prof. dr. Ștefana Jurcoane și domnului prof. dr. Francisc Peter pentru calitatea de referenți oficiali ai tezei de doctorat.

De asemenea, mulțumesc doamnei prof. dr. ing. Elisabetta Maria Guerzoni, pentru găzduirea timp de 10 luni în laboratorul de cercetare din cadrul facultății Scienze degli Alimenti, și suportul științific și material acordat pe perioada stagiului extern.

Mulțumesc și sunt profund recunoscătoare familiei mele, pentru suportul moral, înțelegerea și răbdarea cu care m-au sprijinit, ajutându-mă să duc la bun sfârșit această teză.

*Cu deosebit respect și recunoștință, dedic aceasta teză tatălui meu, **Parfene Neculai**, care mi-a călăuzit fiecare pas pe drumul vieții, fiind alături de mine și ajutându-mă să depășesc orice obstacol, care m-a învățat că numai prin muncă, seriozitate și perseverență pot avea succes în viață. Care, alături de mama, mi-a oferit puterea, încrederea și dragostea necondiționată, pentru a putea merge mai departe, purtând cu onoare numele lui. Vă mulțumesc și sunt mândră că sunteți părinții mei!!!!*

Mulțumesc prietenului meu, Vicențiu Horincar, pentru sprijinul moral, pentru implicarea, dăruirea și seriozitatea cu care m-a susținut în cele mai cumplite momente din viața mea, atunci când tatăl meu s-a așezat printre îngeri.

Mulțumesc tuturor colegilor și profesorilor care mi-au fost aproape și au contribuit atât la formarea mea profesională cât și la cea umană.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



OIPOSDRU



Teza de doctorat a fost elaborată cu sprijinul financiar al Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane (POSDRU) – 88/1.5/S/61445 - Sistem de Management al Burselor Acordate Doctoranzilor - ID 61445, acronim EFICIENT.

Mulțumesc pentru suportul financiar acordat, pentru oportunitatea efectuării stagiului extern în Italia, în laboratoarele din cadrul Facultății de Științe degli Alimenti Universitatea Bologna, Italia.

Obiectivele științifice și justificarea alegerii temei

Tendențele asigurării unei alimentații moderne corelate cu sănătatea populației au determinat intensificarea cercetărilor de înlocuire a aditivilor de sinteză chimică, în special a compușilor conservanți, cu compuși naturali care îndeplinesc același rol, eliminând riscul cumulativ al substanțelor chimice în organism.

Astfel, percepția negativă a consumatorilor față de conservanții artificiali a condus la orientarea cercetărilor către identificarea și utilizarea unor surse alternative de compuși bioconservanți. Pe baza acestor considerente, s-a urmărit descoperirea unor noi surse de compuși cu acțiune conservantă, fără a avea implicații semnificative în modificarea proprietăților senzoriale și nutritive ale alimentelor.

Una dintre aceste surse o constituie grăsimile vegetale (de palmier, cocos și shea) care furnizează lipide cu un conținut ridicat de acizi grași cu potențial antimicrobian.

Teza de doctorat intitulată „**Obținerea, caracterizarea și evaluarea potențialului antimicrobian al unor compuși bioconservanți obținuți prin biotransformarea unor lipide din surse vegetale**” a vizat studiul potențialului antimicrobian al acizilor grași saturați și nesaturați obținuți prin hidroliza enzimatică *in situ* a grăsimilor din palmier (pulpa și respectiv sâmburii fructelor de palmier), cocos și shea, în stare brută. După hidroliza enzimatică în fază solidă, utilizând culturi selecționate de drojdii *Yarrowia lipolytica*, s-a realizat extracția, caracterizarea și cuantificarea acizilor grași utilizând tehnici moderne de cromatografie și, în final, evaluarea potențialului antimicrobian al hidrolizatelor asupra unor bacterii patogene, cu importanță în microbiologia alimentelor.

În acest context, cercetările efectuate pe parcursul studiilor de doctorat au vizat următoarele obiective științifice:

- ✓ Evaluarea specificității lipazelor extracelulare sintetizate de tulpini de drojdii *Yarrowia lipolytica*, pentru grăsimile în stare brută de palmier, cocos și shea.
- ✓ Optimizarea parametrilor de hidroliză *in situ* a grăsimilor vegetale cu drojdii *Yarrowia lipolytica*, prin cultivare în fază solidă, în diferite condiții de temperatură și activitate a apei, similare cu cele din sistemele alimentare și corelate cu condițiile de conservare a alimentelor.
- ✓ Caracterizarea compoziției în acizi grași cu potențial antimicrobian a grăsimilor în stare brută și a hidrolizatelor enzimaticice, utilizând metode

avansate de investigare (extracție în fază solidă, gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă).

- ✓ Evaluarea potențialului antimicrobian al hidrolizateelor conținând acizi grași eliberați prin hidroliză enzimatică din grăsimi de palmier, cocos și shea, împotriva unor bacterii cu incidență în microbiota alimentelor și siguranța alimentară.

Structura tezei de doctorat

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

I. STUDIU DOCUMENTAR

Capitolul 1, intitulat *Conservanți naturali vs. conservanți de sinteză chimică* descrie importanța substituirii adăosului conservanților de sinteză chimică cu cei naturali, în scopul conservării produselor alimentare, eliminând efectul negativ cumulativ al substanțelor chimice xenobiotice asupra organismului uman.

Capitolul 2, intitulat *Grăsimi de origine vegetală – surse potențiale de compuși bioactivi*, este structurat în 4 subcapitole. În primele trei subcapitole sunt descrise, compoziția și caracteristicile fizico – chimice ale grăsimilor vegetale vizate în studiile experimentale, și anume: grăsimea de cocos, grăsimea de shea, grăsimea din pulpa și respectiv din sâmburii fructelor de palmier. Se prezintă efectele biologice recunoscute ale acestor grăsimi, obținute prin metode tradiționale în Africa, fără aplicarea tratamentelor termice sau chimice. În ultimul subcapitol sunt descriși principalii acizi grași cu activitate antimicrobiană, cu efect microbiostatic și microbicid asupra microorganismelor saprofite și patogene cu incidență în microbiologia alimentelor și siguranța alimentară.

Capitolul 3, intitulat *Metode de hidroliză a grăsimilor*, este structurat în două subcapitole, în care se prezintă principiile moderne de hidroliză chimică și enzimatică a grăsimilor de origine vegetală. Sunt descrise principalele surse de lipaze microbiene, specificitatea și funcționalitatea acestora în procesele de hidroliză a lipidelor de origine vegetală.

Capitolul 4, intitulat *Tehnici moderne de extracție, caracterizarea și evaluarea potențialului antimicrobian al acizilor grași* este structurat în trei subcapitole, în care se face o trecere în revistă a metodelor moderne de extracție a acizilor grași din hidrolizate lipidice, metodele de transesterificare a acizilor grași în esterii metilici

corespunzători, identificarea și cuantificarea acestora prin gaz- cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă și metodele uzuale de evaluare a potențialului antimicrobian.

II.PARTEA EXPERIMENTALĂ

Capitolul 5, intitulat ***Hidroliza enzimatică în fază solidă a lipidelor din surse vegetale***, descrie studiile realizate pentru selecția unor tulpini de drojdii *Yarrowia lipolytica* în funcție de capacitatea acestora de a se dezvolta, în condiții staționare, în fază solidă, pe medii îmbogățite în grăsimi vegetale (din palmier, cocos și shea) și studiile cu privire la specificitatea și comportamentul enzimatic al drojdiilor în diferite condiții de temperatură și activitate a apei, similare cu cele din sistemele alimentare și aplicate pentru conservarea alimentelor.

Capitolul 6, intitulat ***Caracterizarea hidrolizatelor grăsimilor tropicale, identificarea și cuantificarea acizilor grași cu potențial antimicrobian***, a vizat caracterizarea grăsimilor de origine vegetală și a hidrolizatelor enzimatic derivate, obținute prin hidroliză enzimatică *in situ*, cu tulpina selecționată *Yarrowia lipolytica* RO13, din punctul de vedere al conținutului în acizi grași cu potențial antimicrobian. Pentru a determina profilul acizilor grași din grăsimile testate și din hidrolizatele enzimatic s-a realizat extracția acizilor grași prin metoda de extracție în fază solidă (SPE) și analiză gaz -cromatografică cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS). De asemenea, s-a urmărit randamentul de hidroliză prin cuantificarea acizilor grași din hidrolizatele enzimatic, comparativ cu conținutul în grăsimile brute nehidrolizate.

Capitolul 7, intitulat ***Testarea activității antimicrobiene a extractelor conținând acizi grași liberi asupra unor bacteriilor cu potențial patogen***, prezintă rezultatele investigațiilor privind evaluarea potențialului antimicrobian al acizilor grași extrași din grăsimile vegetale în stare brută (grăsimea de cocos, grăsimea de shea, grăsimea din pulpa și sâmburii fructelor de palmier) și din hidrolizatele enzimatic, împotriva unor bacterii potențial patogene Gram - pozitive (*Listeria monocytogenes* și *Bacillus cereus*) și Gram - negative (*Escherichia coli* și *Salmonella Enteritidis*). Efectul bacteriostatic și bactericid al acizilor grași din grăsimi vegetale a fost comparat cu cel al unor antibiotice comerciale, de referință.

Capitolul 8, Concluzii generale, prezintă principalele concluzii rezultate din experimentele realizate ce au vizat obținerea, caracterizarea și evaluarea activității antimicrobiene a unor acizi grași saturați din compoziția grăsimilor de palmier, cocos și shea, în stare brută și după hidroliza enzimatică, condusă *in situ*, cu tulpini selecționate de drojdie *Yarrowia lipolytica*.

În final, sunt prezentate **contribuțiile originale** ale tezei de doctorat, cu impact în dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspectivele pentru continuarea cercetărilor, precum și diseminarea rezultatelor obținute pe fluxul principal al publicațiilor în domeniul de cercetare abordat.

Pentru îndeplinirea activităților de cercetare, în acord cu obiectivele științifice formulate, s-au utilizat infrastructurile moderne de cercetare ale laboratoarelor:

- *Centrul integrat de cercetare și formare pentru biotehnologie aplicată în industria alimentară, Platforma Bioaliment (www.bioaliment.ugal.ro), Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea Dunărea de Jos din Galați.*
- *Laboratoarele de microbiologie, din cadrul Facultății Știința Alimentelor, Universitatea din Bologna, Italia.*

Studiile doctorale au fost susținute financiar de Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane (POS DRU) – 88/1.5/S/61445 - **Sistem de Management al Burselor Acordate Doctoranzilor**- ID 61445, acronim EFICIENT.

Rezultatele obținute în cadrul studiilor doctorale au fost diseminate prin elaborarea a cinci lucrări științifice, dintre care **2 articole publicate în reviste cotate ISI** (*Food Chemistry* și *Romanian Biotechnological Letters*) și **3 articole publicate în reviste indexate în baze de date internaționale** (*Scientific Study & Research Chemistry, Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry; Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca; Analele Universității „Dunărea de Jos” Galați*). Totodată, pe parcursul stagiului doctoral, **au fost comunicate rezultatele cercetărilor la cinci conferințe internaționale.**

Teza de doctorat conține 195 pagini, în care sunt incluse 65 figuri și 8 tabele. Studiul documentar reprezintă 30% iar partea experimentală 70%.

5. Hidroliza enzimatică în fază solidă a lipidelor din surse vegetale

Prezentul studiu a urmărit selecția unor tulpini de drojdii *Yarrowia lipolytica*, capabile să producă hidroliza *in situ* a grăsimilor din palmier, cocos și shea, în stare brută, în diferite condiții de temperatură și activitate a apei, similare cu cele din sistemele alimentare, în vederea eliberării cu eficiență sporită și în condiții simple și eficiente din punct de vedere economic a acizilor grași cu activitate antimicrobiană.

5.2 Materiale și metode

5.2.1 Reactivi, materiale și culturi starter

▪ Grăsimi vegetale tropicale

Au fost utilizate trei tipuri de grăsimi tropicale, în stare brută, după cum urmează: grăsimi de palmier (pulpa și sâmburii fructelor de palmier), de cocos și de shea, obținute prin procedee tradiționale de procesare, în Cameroon, Africa.

▪ Culturi starter de drojdii

Treisprezece tulpini de drojdii *Yarrowia lipolytica*, din colecția de microorganisme a facultății Scienze degli Alimenti, Cesena din cadrul Universității Bologna, Italia, provenind din diferite surse (tabelul 5.1).

Tabelul 5.1 Tulpini de drojdii *Yarrowia lipolytica*, potențiale surse de lipaze

| Nr.crt. | Tulpini de <i>Yarrowia lipolytica</i> , cod | Sursa de izolare |
|---------|--|--|
| 1 | RO13, RO3 și RO15 | unt de tip „light” |
| 2 | PO1 | apa fluviului Po, Italia |
| 3 | Y10, Y22 și 1 II YL 4 | produse refrigerate din carne, tip prosciutto cotto, crudo |
| 4 | LP PAST to 1a, LC TQ to 4b, LP TQ to 1a și LN2 | brânză de capră, tip: „pecorino” și „caciotta” |
| 5 | 16B și 27D | carne de pui iradiată |

▪ Medii de cultură

- *Mediul Sabouraud cu agar* (Merck KgaA Darmstad, Germany), pentru multiplicarea și întreținerea culturilor de drojdii.
- *Mediul Spirit blue cu agar* (SBA) (DIFCO Laboratoires Detroit Mi, USA) pentru evaluarea activității lipolitice a drojdiilor. Pentru modificare activității apei la valori de 0,98 0,96 și 0,93, mediul SBA a fost suplimentat cu diferite concentrații de clorură de sodiu.

5.2.2 Hidroliza enzimatică *in situ* a grăsimilor vegetale cu tulpini de *Yarrowia lipolytica*

▪ Prepararea inoculului de drojdie

Pentru prepararea inoculului, tulpinile de drojdie *Yarrowia lipolytica* au fost reactivat prin cultivare pe mediul de cultură Sabouraud cu agar, în plăci Petri, la temperatura de 28°C, timp de 72 de ore. În prealabil, s-au preparat eprubete cu un conținut de 7-8 mL de mediu Sabouraud lichid steril. Cu ajutorul unei anse, s-au recoltat celule din culturile pure (colonii) care apoi s-au inoculat aseptice în mediul Sabouraud lichid, în eprubete și s-au termostatat la temperatura de 28°C, timp de 72 de ore. Aceste culturi au constituit preinoculul.

Inoculul de drojdie utilizat în aceste studii s-a obținut prin transferarea a 1 mL din preinocul în eprubete cu mediu Sabouraud lichid, steril (SAB) și termostatare timp de 72 de ore, la temperatura de 28°C. Dimensiunea inoculului s-a stabilit prin determinarea numărului unităților formatoare de colonii (ufc mL⁻¹) stabilit prin tehnica indirectă de numărare a coloniilor dezvoltate prin cultivare pe mediul Sabouraud cu agar, în plăci Petri, la temperatura de 25°C (SR ISO 7954:2001). Pentru toate culturile de drojdie s-a utilizat o dimensiune a inoculului de 10⁶ ufc mL⁻¹.

▪ Evaluarea potențialului lipolitic *in situ* al drojdiilor *Yarrowia lipolytica*

Pe suprafața mediului SBA în care s-a înglobat grăsimea de cocos s-a aplicat în centrul plăcii câte 30 μL din fiecare cultură pură (inocul). În paralel s-au realizat probe martor pentru fiecare valoare a activității apei și a temperaturii testate, fără inocul.

Probele s-au realizat în duplicat. În total s-au realizat 672 de probe din care o parte au fost termostatate la temperatura optimă de creștere a drojdiei, respectiv 25°C, iar cealaltă parte la temperatura de refrigerare de 4°C, timp de 240 de ore.

Evaluarea capacității drojdiilor de a sintetiza lipaze extracelulare și de a hidroliza grăsimile tropicale testate (palmier, cocos și shea) s-a evidențiat prin apariția unui halou incolor, în comparație cu restul mediului de culoare albastru, în jurul coloniilor tulpinilor active. Diametrul zonei de hidroliză a fost măsurat la intervale de 24 de ore (Frank & Bullerman, 1993).

5.2.3 Metode de analiză și prelucrare statistică a datelor experimentale

Pentru stabilirea condițiilor optime de hidroliză *in situ* a grăsimilor s-a folosit programul Principal Components Analyses (PCA) cu soft-ul The Unscrambler x.10.1, Camo software, Oslo, Norvegia (Esbensen, 2010). Algoritmul folosit în prelucrarea datelor a fost NIPALS, iar validarea tuturor rezultatelor s-a realizat cu programul Full Cross Validation.

5.3 Rezultate și discuții

5.3.1 Hidroliza enzimatică *in situ* a grăsimii de palmier

5.3.1.1 Funcționalitatea drojdiilor *Yarrowia lipolytica* și hidroliza grăsimii de palmier la temperatura de 25°C și diferite valori ale activității apei

Hidroliza enzimatică în fază solidă a grăsimii de palmier (pulpa fructelor și sâmburi de palmier) s-a realizat prin varierea condițiilor de cultivare a drojdiilor și anume: tipul de grăsime, concentrația de NaCl din mediu, corelată cu conținutul de apă liberă (valori ale a_w 0,93, 0,95 și 0,98), temperatura și durata cultivării. Studiile au demonstrat că drojdiile *Yarrowia lipolytica* funcționează optim la cultivarea în sistem SSF (engl. *Solid State Fermentation*) pe mediu îmbogățit în grăsime extrasă din pulpă de palmier și concentrații reduse de NaCl în mediu (3% NaCl, a_w 0,98) (figura 5.3). Toate cele treisprezece tulpini de *Yarrowia lipolytica* testate, prezintă capacitatea de a hidroliza grăsimea de palmier, în condițiile testate, după 48 de ore de cultivare, ceea ce certifică potențialul acestor drojdii de a produce lipaze extracelulare cu specificitate pentru grăsimea din palmier.

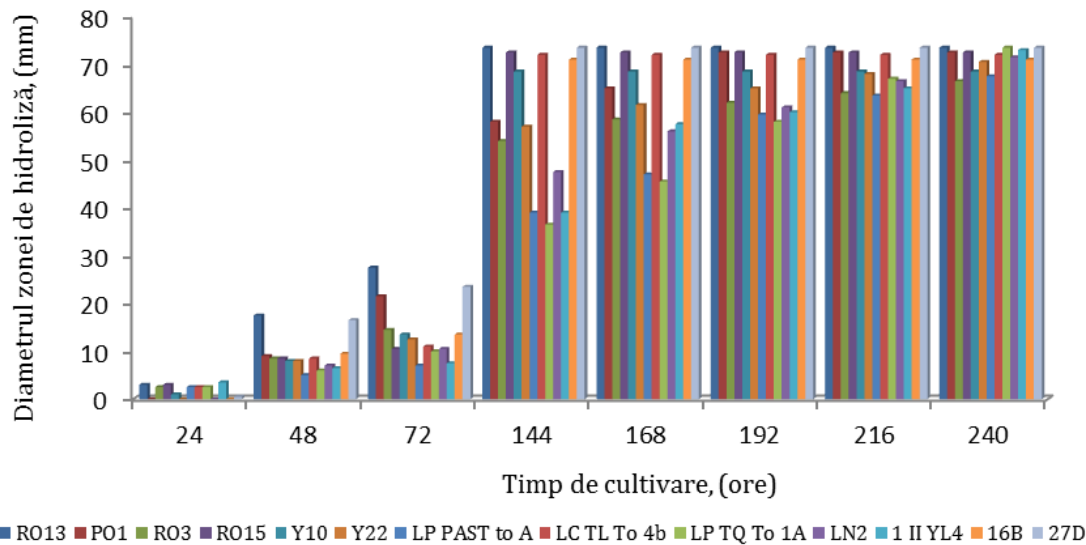


Figura 5.3. Capacitatea drojdiilor *Yarrowia lipolytica* de a produce hidroliza grăsimii extrasă din pulpa fructelor de palmier, în sistem SSF la temperatura de 25°C și activitatea apei 0,98

În cazul utilizării ca substrat a grăsimii obținute din sâmburii fructelor de palmier s-a observat un comportament similar al drojdiilor. La temperatura de 25°C și aw 0,98, cele mai active tulpini s-au dovedit cele codificate 1I IYL4, RO13, 27D și 6B, care au prezentat zone de hidroliză a grăsimii încă din primele ore de cultivare în sistem SSF (figura 5.4).

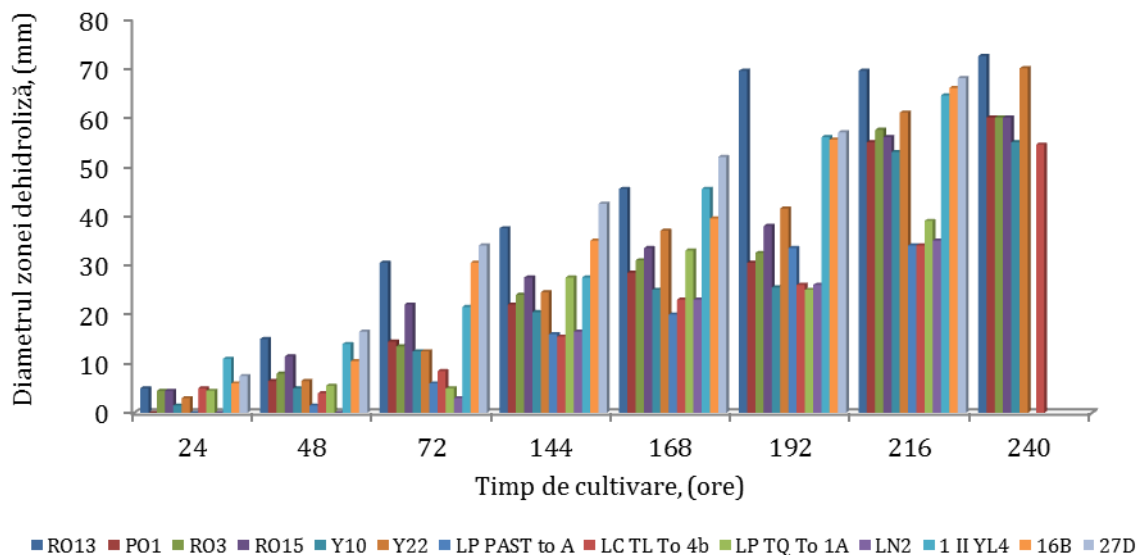


Figura 5.4. Creșterea drojdiilor *Yarrowia lipolytica* și hidroliza grăsimii din sâmburii fructelor de palmier, la cultivarea în sistem SSF, la temperatura de 25°C și activitatea apei 0,98

Tulpina *Yarrowia lipolytica* RO13 s-a dovedit și în acest caz cea mai activă. Aceasta a produs zone de hidroliză cu dimensiuni de circa 30 mm, după 24 de ore de cultivare, de 72 mm, după 48 h de cultivare și a hidrolizat complet grăsimea din sâmburii de palmier, după 168 h de cultivare. Prin creșterea concentrației de sare din mediu, corelată cu scăderea activității apei comportamentul drojdiilor se modifică (figura 5.5 și figura 5.6). Din datele prezentate în figura 5.5 se observă efectul inhibitor al creșterii concentrației de NaCl (6%) corelat și cu conținutul de apă liberă asupra funcționalității drojdiilor, ceea ce se reflectă în întârzierea cu 24 de ore a procesului de hidroliză, la temperatura optimă de activitate fiziologică a drojdiilor, 25°C.

Tulpinile *Yarrowia lipolytica* RO13 și RO15 s-au dovedit și în acest caz cele mai performante, pentru care s-au obținut cele mai mari zone de hidroliză a grăsimii extrasă din pulpa fructelor de palmier și la valori ale activității ale apei în mediu de 0,96 (10 – 30 mm în intervalul de timp de 48 – 72 de ore de cultivare, și respectiv 60 – 70 mm în intervalul de 144 – 240 de ore de cultivare).

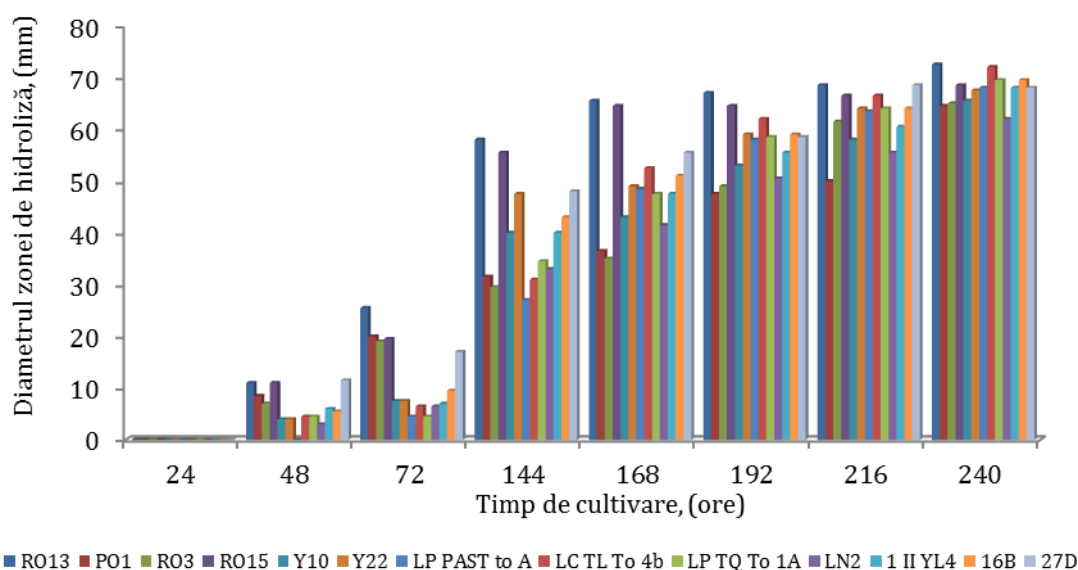


Figura 5.5 Creșterea drojdiilor *Yarrowia lipolytica* și hidroliza grăsimii din pulpa fructelor de palmier la cultivarea în sistem SSF, la temperatura de 25°C și activitatea apei 0,96

Când substratul a fost grăsimea extrasă din sâmburii de palmier, comportamentul tulpinilor de drojdie este similar, cu o evidentă reducere a activității fiziologice datorită conținutul moderat de sare în mediu (6% NaCl) și un conținut de apă liberă în mediu de 0,96 (figura 5.6). Și în acest caz s-a evidențiat tulpina *Yarrowia lipolytica*

R013 cu potențial superior de metabolizare a grăsimii din sâmburi de palmier, după 48 de ore de cultivare.

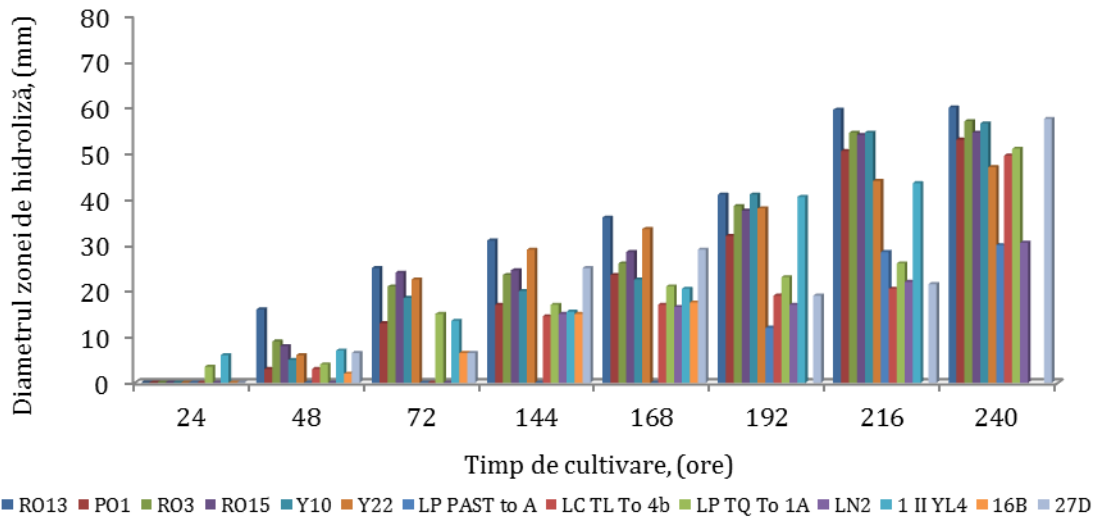


Figura 5.6 Hidroliza grăsimii din sâmburii fructelor de palmier cu tulpini de *Yarrowia lipolytica* (temperatura 25°C, activitatea apei 0,96)

Din figura 5.7 se observă că odată cu scăderea activității apei până la valoarea de 0,93, respectiv creșterea conținutului de sare (10,1% NaCl) în mediu, s-a diminuat viteza de dezvoltare a coloniilor de drojdie *Yarrowia lipolytica* pe mediul îmbogățit în grăsime extrasă din pulpa fructelor de palmier. Astfel, au fost evidențiate întârzieri semnificative (de 72 de ore) ale metabolizării lipidelor și apariției zonelor de hidroliză a substratului. Aceste zone au fost vizibile abia după 72 de ore de cultivare. În intervalul de timp 72 – 240 ore, s-a constatat că tulpina de drojdie R013 a fost cea mai activă din punct de vedere al activității lipolitice față de grăsimea din pulpa fructelor de palmier, relevând zone de hidroliză cu diametrul cuprins între 30 - 50 mm, în intervalul de timp 144 – 240 de ore de cultivare, urmată de tulpinile codificate R03 și Y22 care au generat zone de hidroliză cu diametre cuprinse între 30 – 45 mm, în perioade similare de cultivare.

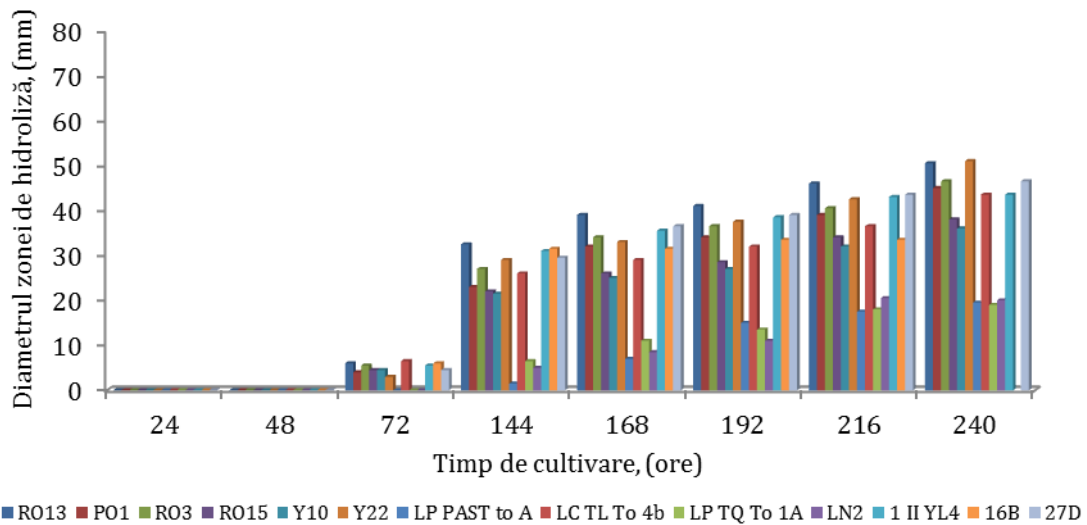


Figura 5.7 Variabilitatea potențialului de dezvoltare și producerea de lipaze extracelulare pentru hidroliza grăsimii din pulpă de palmier la cultivarea în sistem SSF a drojdiilor *Yarrowia lipolytica* (temperatura de 25°C, aw 0,93)

În condiții similare, pentru grăsimea extrasă din sâmburii de palmier, gradul de transformare este evident încetinit la cel mai redus nivel al activității apei testat (0,93), cele mai active tulpini s-au dovedit tulpinile cu cod P01 și R013, care au indus hidroliza grăsimii din sâmburi de palmier pe o suprafață cu diametru de 40 mm, după 144 de ore de cultivare în sistem SSF, la temperatura de 25°C și aw 0,93 (figura 5.8).

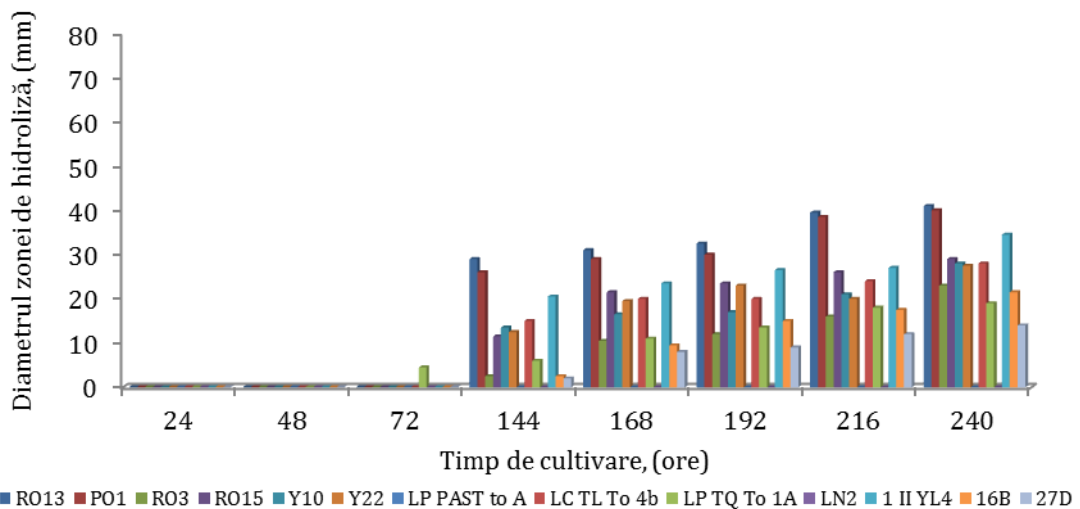


Figura 5.8 Hidroliza *in situ* a grăsimii din sâmburii fructelor de palmier cu lipazele extracelulare sintetizate de drojdiile *Yarrowia lipolytica* (temperatura 25°C, activitatea apei 0,93)

5.3.1.2 Comportamentul drojdiilor *Yarrowia lipolytica* la cultivarea în sistem SSF, pe mediu îmbogățit în grăsime din pulpa fructelor și din sâmburii de palmier, la temperatura de 4°C și diferite valori ale activității apei

Studiul comportamentului drojdiilor la temperaturi scăzute prezintă importanță practică din perspectiva optimizării condițiilor de conservare. Studiile conduse la temperatura de 4°C au fost derulate în condiții similare cu cele realizate la temperatura de 25°C.

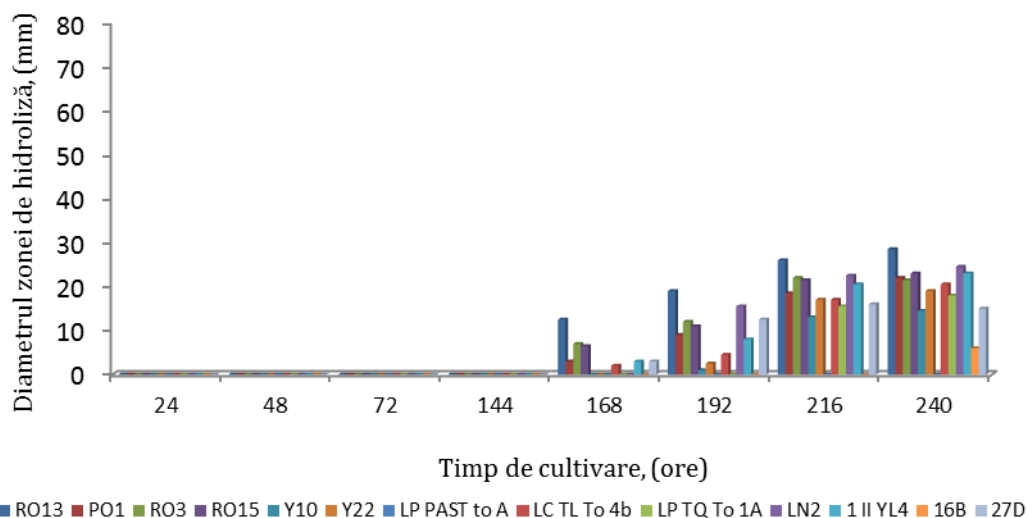


Figura 5.9 Capacitatea drojdiilor *Yarrowia lipolytica* de a metaboliza grăsimea extrasă din pulpa fructelor de palmier, prin cultivare în sistem SSF, la temperatura de 4°C și activitatea apei 0,98

Scăderea temperaturii până la 4°C, corelată cu conținutul de sare în mediu de 3 % (a_w 0,98), a determinat o întârziere de peste 100 de ore a procesului de hidroliză *in situ* a grăsimii din pulpa fructelor de palmier. Și la temperatura de 4°C, tulpina cu cea mai intensă activitate lipolitică s-a dovedit tulpina *Yarrowia lipolytica* RO13, care prezintă cea mai mare specificitate față de grăsimea din pulpa fructelor de palmier.

În condiții similare, s-a urmărit și hidroliza grăsimii extrasă din sâmburii fructelor de palmier. Din datele prezentate în figura 5.10 se observă o lungă perioadă de latență, de circa 144 de ore, în transformarea grăsimii din sâmburii de palmier, prin păstrare la temperatura de 4°C. Acest comportament oferă premise în conservarea alimentelor, în care se intenționează utilizarea efectului bioconservant al acizilor grași eliberați din lipide pentru a prelungi conservabilitatea produselor alimentare.

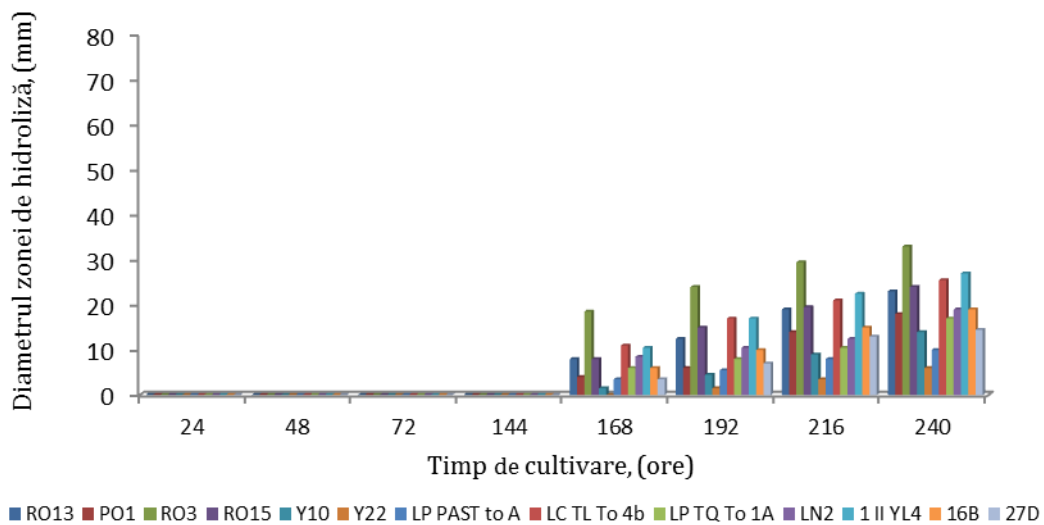


Figura 5.10 Biotransformare *in situ* a grăsimii obținută din sâmburii fructelor de palmier cu tulpini de *Yarrowia lipolytica*, la temperatura de 4°C și activitatea apei 0,98

În intervalul 168 – 240 de ore, cele mai eficiente tulpini de drojdie au fost LP TQ to 1a, LC TL to 4b, și 1 II YL4. Acestea din urmă au pus în libertate lipaze cu specificitate mare față de substratul utilizat; astfel încât, chiar și în condiții critice de temperatura (4°C) și activitatea apei (a_w 0,98), aceste lipaze au prezentat o activitate lipolitică suficient de mare luând în considerare valorile parametrilor la care s-a desfășurat hidroliza enzimatică a grăsimii din sâmburii fructelor de palmier.

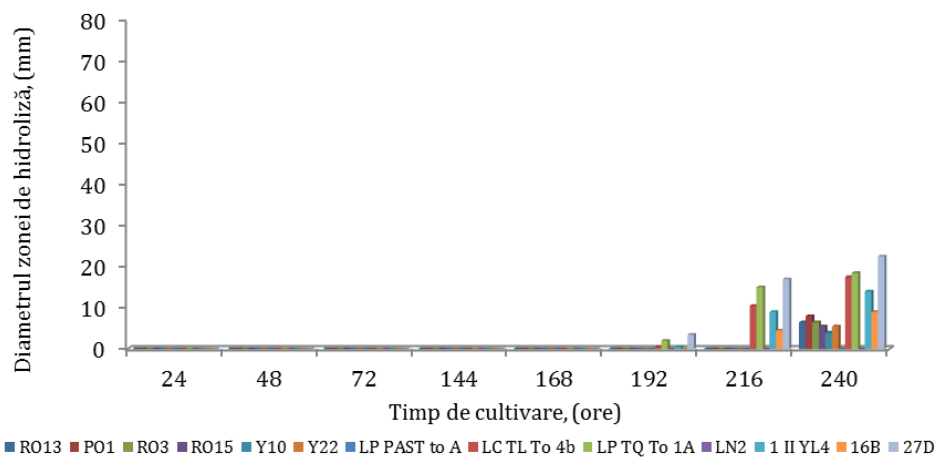


Figura 5.11 Bioconversia *in situ* a grăsimii din pulpa de palmier la temperatura de 4°C și activitatea apei a_w 0,96

În figura 5.11 se observă că o dată cu creșterea conținutului de sare în mediu (a_w 0,96), și scăderea temperaturii la 4°C, capacitatea drojdiilor de a hidroliza grăsimea

extrasă din pulpa fructului de palmier scade semnificativ, fiind necesar un timp de contact îndelungat al drojdiei cu substratul pentru a realiza transformarea acestuia.

În ceea ce privește biotransformarea grăsimii din sâmburii fructelor de palmier, în condiții similare de cultivare, din figura 5.12, se poate remarca faptul că, abia după 168 de ore de cultivare, au fost vizibile primele zone de hidroliză, în cazul tulpinilor RO3 și RO15, cu diametre de 5,5 mm și respectiv 2,5 mm (figura 5.12).

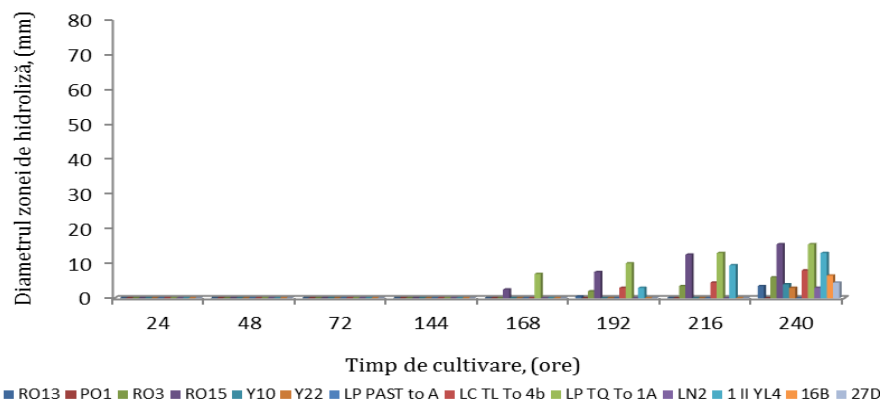


Figura 5.12 Dinamica hidrolizei în sistem SSF a grăsimii din sâmburii fructelor de palmier la temperatura de 4°C, activitatea apei 0,96

La valoarea activității apei de 0,93 și temperatura de 4°C, nici o tulpină de drojdie *Yarrowia lipolytica*, dintre cele testate, nu a fost capabilă să crească și să producă lipaze extracelulare, pe nici un tip de grăsime din palmier.

5.3.2 Hidroliza enzimatică *in situ* a grăsimii de cocos

5.3.2.1 Efectul corelat al temperaturii și al activității apei asupra capacității drojdiilor *Yarrowia lipolytica* de a transforma grăsimea de cocos

Hidroliza enzimatică a grăsimii de cocos s-a realizat în aceleași condiții de cultivare pe mediu solid îmbogățit cu 3% grăsime de cocos, în stare brută, la temperatura de 25°C și valori ale activității apei de 0,98, 0,96 și 0,93 și a fost urmărită în intervalul 0 – 240 de ore de cultivare (figura 5.17 a, b, c).

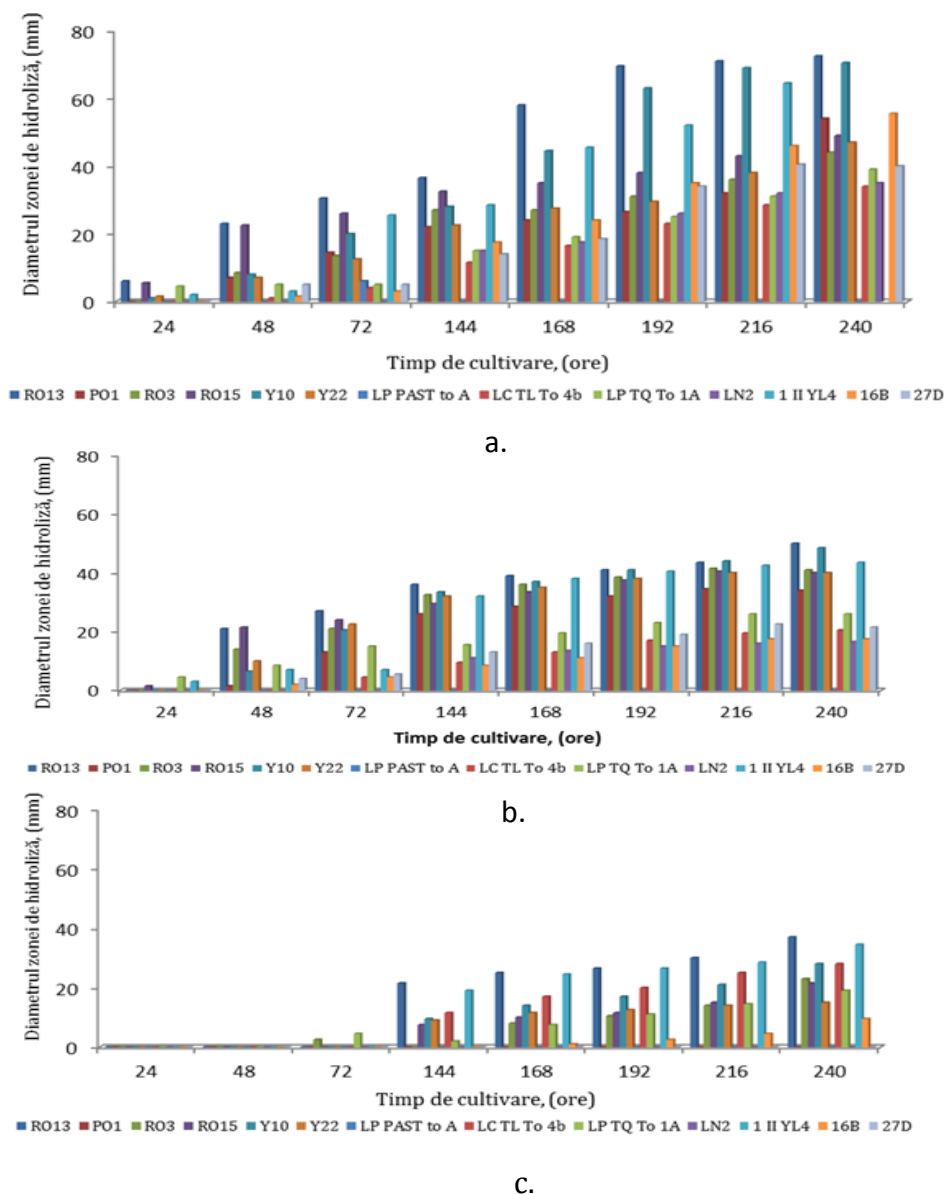


Figura 5.17 Hidroliza *in situ* a grăsimii de cocos cu tulpini de *Yarrowia lipolytica*, la temperatura de 25°C și diferite valori ale activității apei a) 0,98; b) 0,96; c) 0,93

Și în acest caz tulpina de drojdie *Yarrowia lipolytica* RO13 s-a dovedit cea mai activă dintre cele treisprezece tulpini studiate. Activitatea lipolitică se diminuează pe măsura reducerii activității apei, corelat și cu creșterea concentrației de apă liberă în mediu.

c.

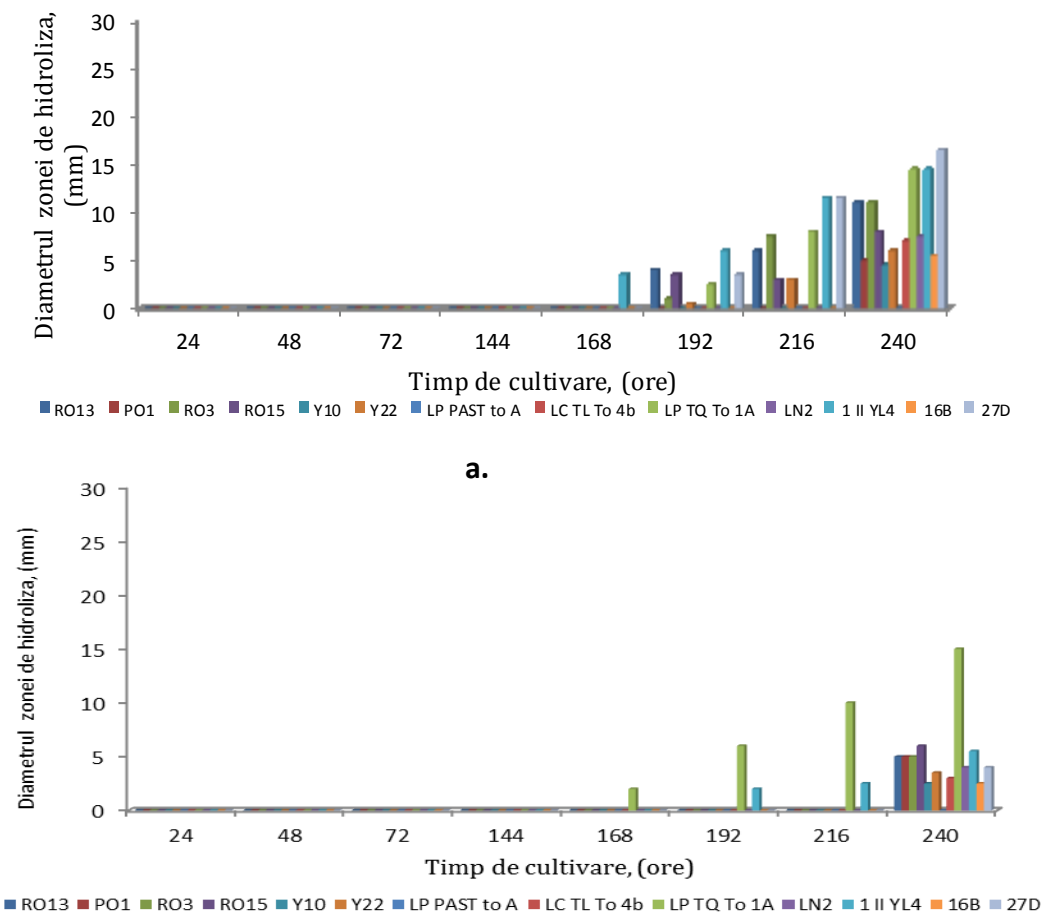


Figura 5.18 Hidroliza *in situ* a grăsimii de cocos cu tulpini de *Yarrowia lipolytica*, la temperatura de 4°C și diferite valori ale activității apei a) 0,98; b) 0,96

În cazul cultivării drojdiilor la temperatura de 4°C, activitatea lipolitică a drojdiilor s-a diminuat considerabil, astfel încât primele zone de hidroliză au fost evidente după 168 de ore de cultivare, cea mai activă fiind în acest caz tulpina *Yarrowia lipolytica* 1IIYL4, însă diametrul zonei de hidroliză a fost doar de 3 mm, la cea mai mare valoare a activității apei (0,98)(figura 5,18 a, b).

La valoarea aw de 0,96 tulpina *Yarrowia lipolytica* LP TQ to 1a s-a adaptat cel mai bine, iar după 192 și respectiv 240 de ore de cultivare a produs zone de hidroliză cu diametre de 5 mm și respectiv 15 mm.

Toate celelalte tulpini s-au adaptat greu în condiții restrictive de cultivare. La valoarea activității apei de 0,93 și temperatura de 4°C, nici una dintre tulpinile de drojdie nu s-a dezvoltat.

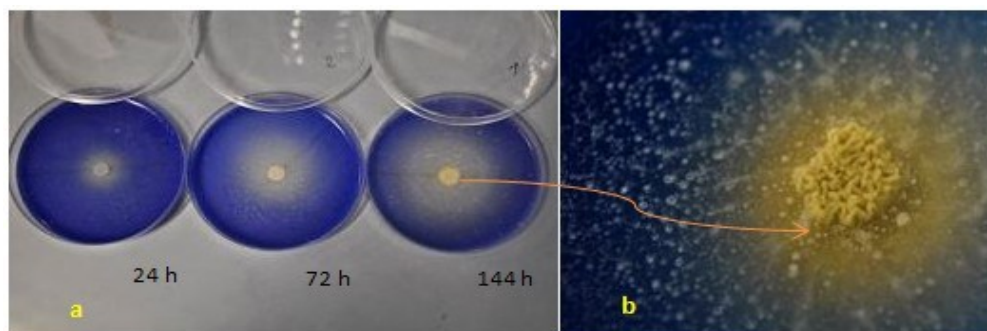


Figura 5.20 Hidroliza enzimatică în fază solidă a grăsimii de cocos, la temperatură 25°C și activitatea apei 0,98, după 24 – 144 de ore de cultivare a drojdiilor în sistem SSF (a); colonie *Yarrowia lipolytica* dezvoltată după 144 de ore (b)

5.3.3 Hidroliză enzimatică *in situ* a grăsimii de shea

5.3.3.1 Efectul corelat al temperaturii și al activității apei asupra capacității drojdiilor *Yarrowia lipolytica* de a transforma grăsimea de shea

S-a studiat comportamentul drojdiilor prin cultivare pe grăsime de shea, la temperatura de 25°C și activitatea apei 0,98, 0,96 și 0,93, timp de 240 ore. Din figura 5.22 a, b și c, se observă că drojdiile prezintă specificitate pentru grăsimea de shea în stare brută, hidroliza fiind vizibilă încă din primele 24 de ore de cultivare. Și în acest caz, tulpina *Yarrowia lipolytica* R013 a fost cea mai eficientă tulpină producătoare de lipaze.

Acest potențial al tulpinii *Yarrowia lipolytica* R013 este ușor diminuat dacă se compară cu capacitatea lipolitică a acestei tulpini de a transforma grăsimea de palmier și de cocos. Alte tulpini de drojdii cu specificitate pentru grăsimea de shea s-au dovedit a fi tulpinile R03, R015, P01, Y22 și 16B, care au produs zone de hidroliză cu diametre de 30-50 mm.

Odată cu creșterea conținutului de sare în mediu (a_w 0,96), randamentul de hidroliză s-a diminuat, însă comparativ cu celelalte grăsimi studiate anterior, pe grăsimea de shea drojdiile s-au dezvoltat relativ bine și au hidrolizat grăsimea și în mediu cu 6% NaCl, la activitatea apei 0,96.

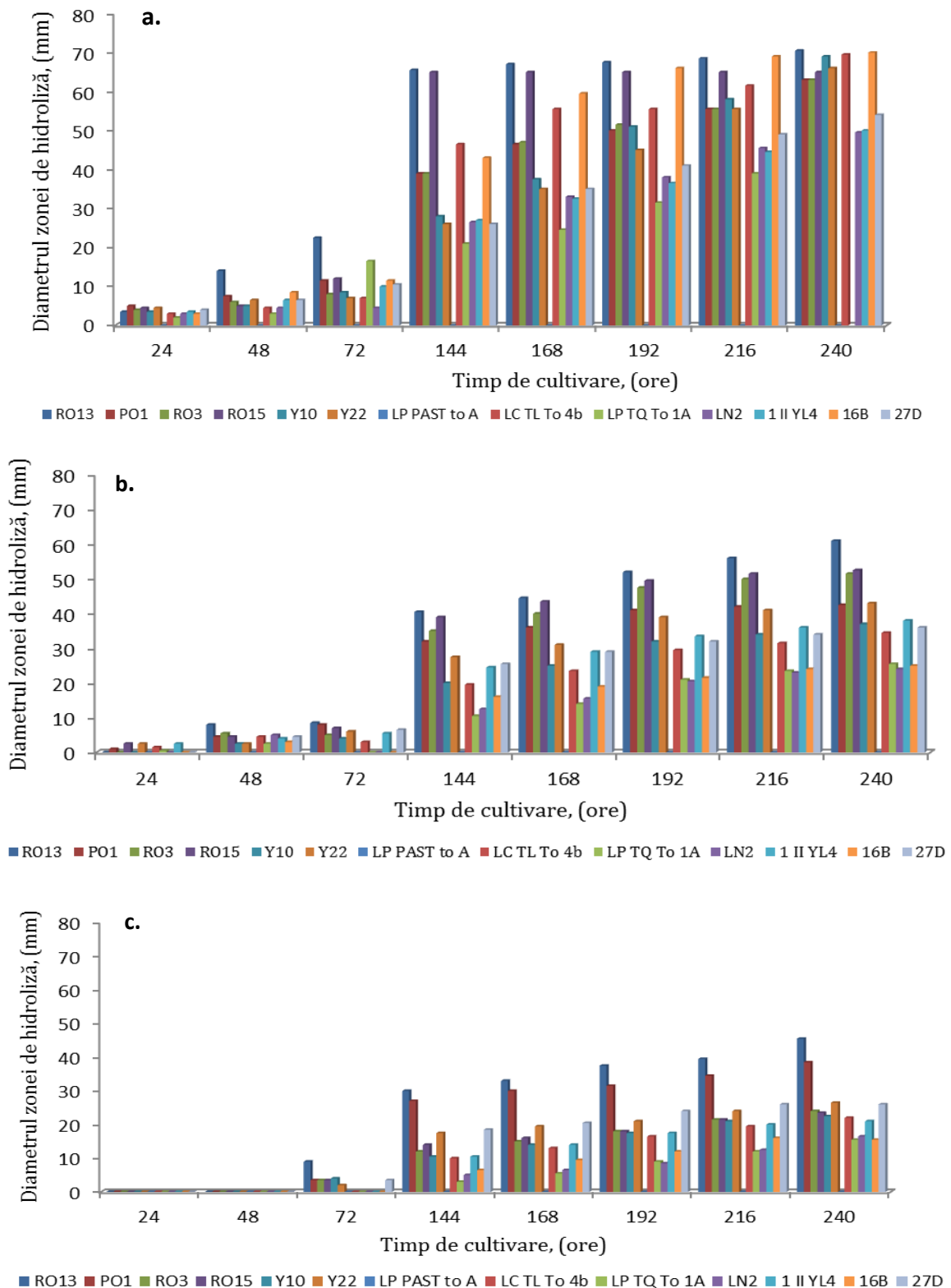


Figura 5.22 Comportamentul hidrolitic asupra substratului grăsime de shea al drojdiilor *Yarrowia lipolytica*, prin cultivare în sistem SSF, la temperatura de 25°C și, activitatea apei 0,98 (a); 0,96 (b) și 0,93 (c)

La activitatea apei 0,93, după 72 de ore de cultivare, 7 dintre cele 13 tulpini de drojdie testate au produs lipaze extracelulare iar dintre acestea tulpina *Yarrowia lipolytica* R013 a avut cele mai bune performanțe, producând zona de hidroliză cu diametru de 45 mm.

La temperatura de 4°C și activitatea apei de 0,98, abia după 168 de ore de cultivare, au fost vizibile primele zone de hidroliză, tulpinile active fiind: R013, P01, R03, R015, Y10, Y22, LC TL to 4b, LP TQ to 1a, LN2, 1IIYL4 și 27 D (figura 5.24 a).

La temperatura 4°C și activitatea apei de 0,96, primele zone de hidroliză au fost vizibile după 168 de ore de cultivare, cele mai active tulpini fiind R03, R013 și R015.

La activitatea apei de 0,93 nici una dintre tulpinile testate nu a metabolizat grăsimea de shea.

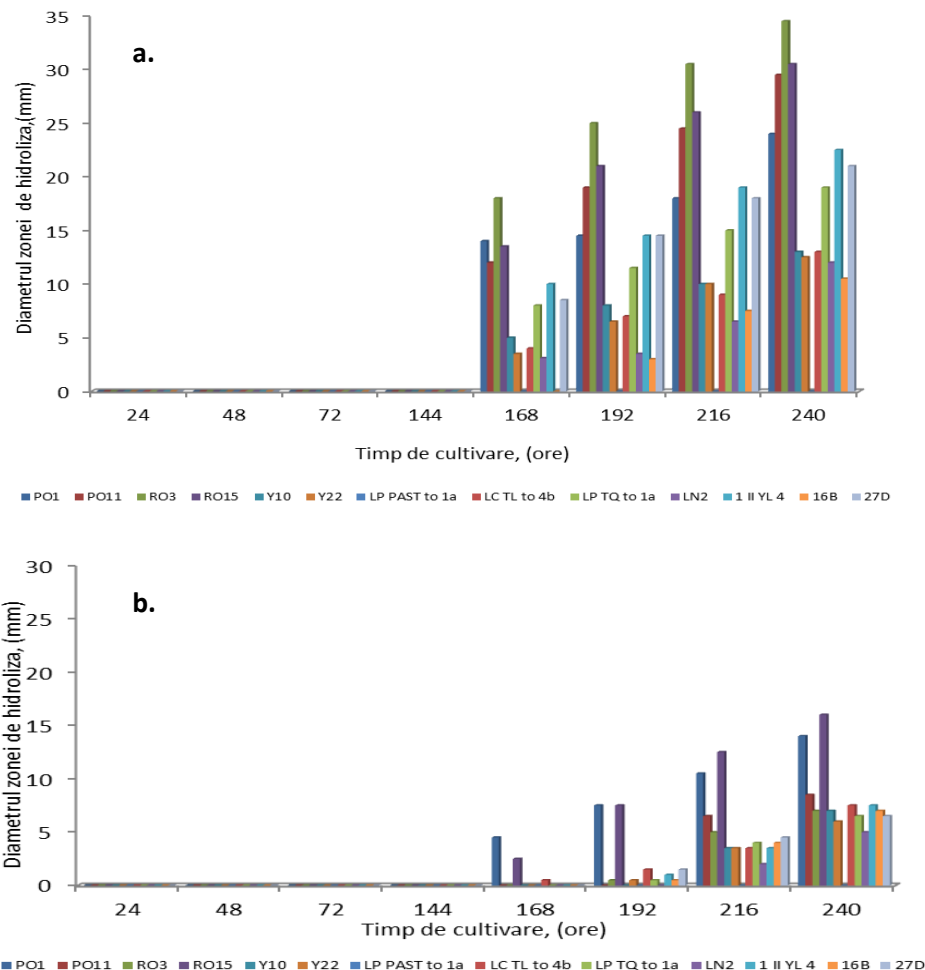


Figura 5.23 Hidroliza *in situ* a grăsimii de shea cu ajutorul lipazelor produse de tulpini de *Yarrowia lipolytica*, la temperatura de 4°C, activitatea apei 0,98 (a) și 0,96 (b)

5.3.4 Stabilirea condițiilor optime de hidroliză enzimatică *in situ* a grăsimilor tropicale cu drojdii *Yarrowia lipolytica* prin analiza componentelor principale

Analiza componentelor principale (PCA) s-a aplicat pentru studiul pe principii statistice a corelațiilor dintre variabilele independente: condițiile de hidroliză, tulpini de drojdie și variabile dependente (răspuns): gradul de hidroliză, viteza de hidroliză, în vederea optimizării condițiilor de hidroliză.

În analiza PCA a fost prelucrat un set de date care a cuprins 2498 de probe, caracterizate prin:

- tulpina de drojdie: **1-** Y10; **2-** Y22; **3-** LP PAST to a; **4-** PO1; **5-** RO13; **6 -** RO15; **7 -** RO3; **8-**LC TL To 4b; **9-**LP TQ To 1a; **10-**LN2; **11-**1 II YL4; **12-**16B; **13-**27D;
- tipul de grăsime: **1-** grăsimea din pulpa fructelor de palmier, **2-** grăsimea din sămburii fructelor de palmier, **3-** grăsimea de cocos, **4 –** grăsimea de shea;
- temperatura de cultivare: 4°C și 25°C;
- activitatea apei: 0,98; 0,96; 0,93;
- timpul de cultivare: 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 196, 240 de ore.

Răspunsul, randamentul de hidroliză, s-a determinat indirect pe baza parametrilor: diametrul coloniei (dc), diametrul zonei de hidroliză din jurul coloniei, (dH), diferența acestora (dif). Fiecare componentă principală reprezintă o corelație a variabilelor analizate : timpul, activitatea apei, temperatura, diametrul coloniei (dc), diametrul zonei de hidroliză (dH) și diferența dintre cele două diametre (dif), în care distribuția datelor se realizează în funcție de următorii parametri: tulpinile de drojdie (PC 1 și PC 2), tipul de grăsime (PC 3), temperatura și activitatea apei (PC 4), și timpul de cultivare (PC 5). Pentru primele două componente principale, probele au fost grupate în funcție de tulpina de drojdie folosită (Range1: Y10; Range 2: Y22; Range 3: LP PAST to a; Range 4: PO1; Range 5: RO13; Range 6: RO15; Range 7: RO3; Range 8: Range LC TL To 4b; Range 9: LP TQ To 1a; Range 10: LN2; Range 11: 1 II YL4; Range 12: 16B; Range 13: 27D).

Din figura 5.29 a și b se observă că PC1 (care explică 43 % din variația datelor) este influențată de timpul de cultivare, temperatură, activitatea apei, dar și diametrul coloniei (dc), diametrul zonei de hidroliză (dH) și diferența acestora (dif).

De asemenea, se observă că diametrele coloniei, zonei de hidroliză și diferența acestora sunt foarte bine corelate între ele, astfel încât o dată cu modificarea unui astfel de parametru se induce modificarea celorlalți parametri.

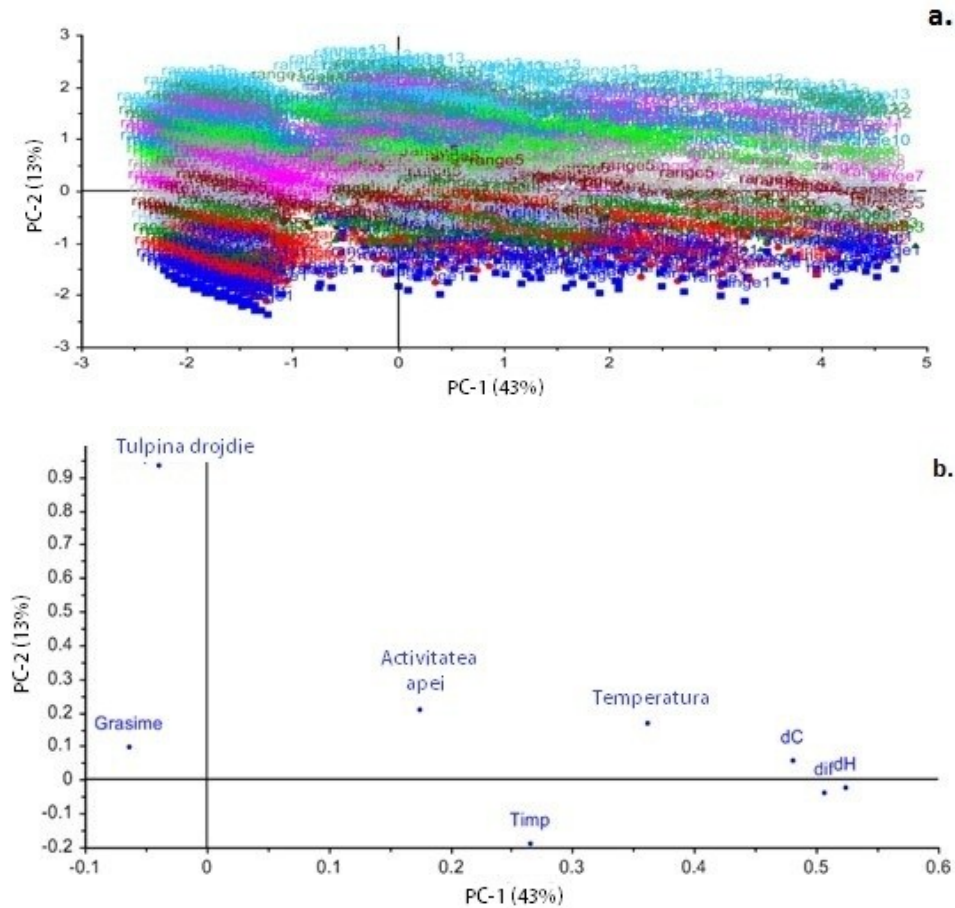


Figura 5.29 Graficul probelor (a) și a variabilelor (b) pentru primele 2 componente principale (PC1 și PC2) și gruparea probelor în funcție de tulpina de drojdie

A doua componentă principală (PC 2), care explică 13 % din variația datelor este dată de tipul de grăsime folosit (Range1- grăsimea din pulpa fructelor de palmier, Range 2- grăsimea din sâmburii fructelor de palmier, Range 3- grăsimea de cocos, Range 4 – grăsimea de shea).

Din figura 5.32, se poate observa că PC 4 (care explică 13 % din variația datelor) este dat de variația activității apei (aw)(figura 5.32 b) și de temperatura de cultivare (figura 5.32 a).

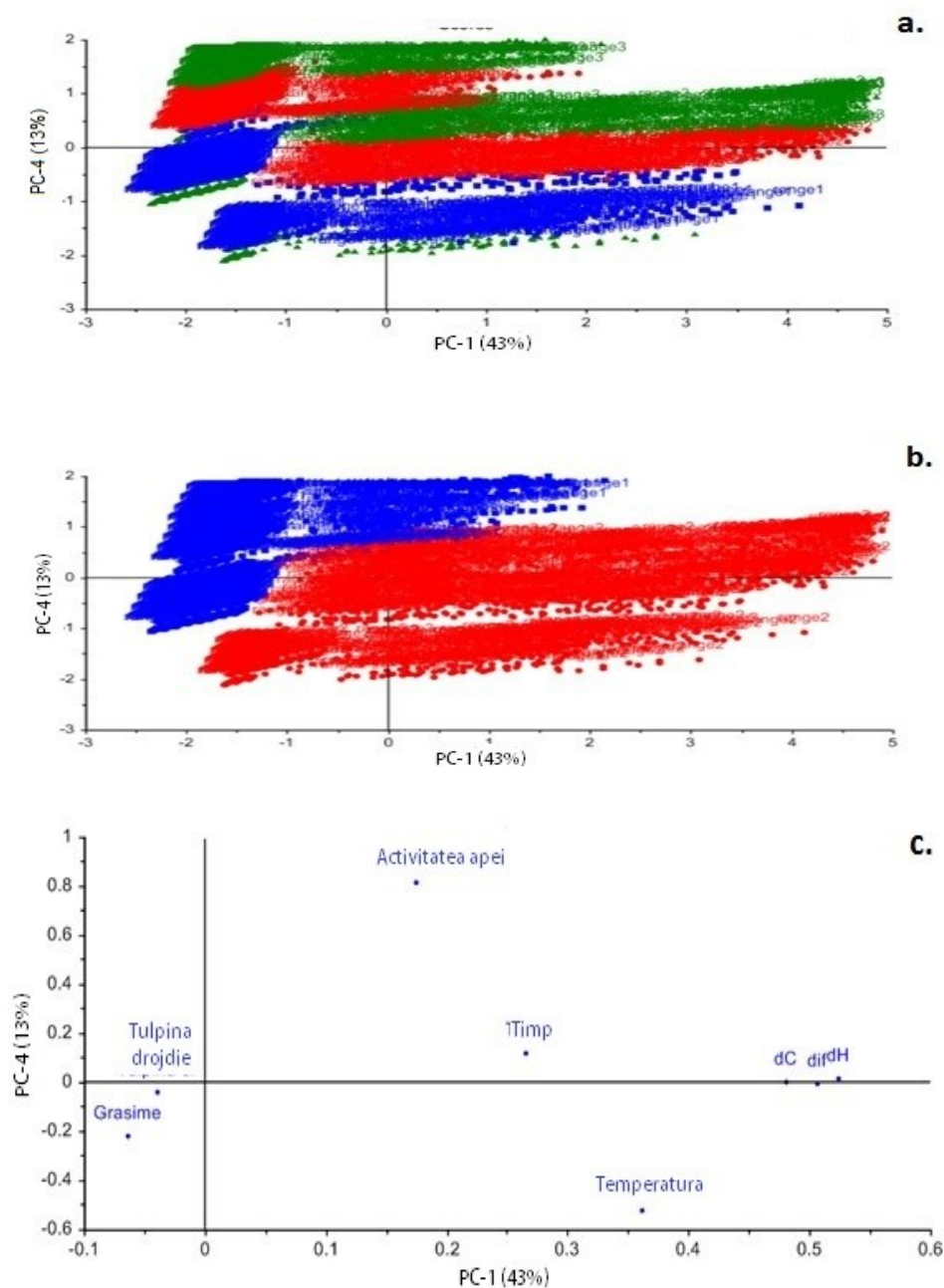


Figura 5.32 Graficele probelor și variabilelor pentru componentele principale (PC 1 și PC 4) cu distribuția probelor în funcție de: a.- activitatea apei (aw 0,93 – albastru, aw 0,96 – roșu, aw 0,98 – verde); b.- temperatură (albastru - 4°C și roșu - 25°C), c. – graficul variabilelor

5.4 Concluzii parțiale

1. S-a testat capacitatea a treisprezece tulpini de drojdii *Yarrowia lipolytica*, provenind din diferite surse și păstrate în Colecția Universității din Bologna, Italia, de a produce hidroliza în stare solidă a trei grăsimi tropicale în stare brută (palmier, cocos și shea), în diferite condiții fizico-chimice de cultivare.
2. Toate tulpinile de *Yarrowia lipolytica* studiate au prezentat capacitatea de a produce hidroliza grăsimilor testate la temperaturi de 25°C și 4°C și valori ale activității apei 0,98, 0,96 și 0,93, în timp de 240 de ore.
3. Comportamentul lipolitic al drojdiilor este diferențiat în funcție de tulpină, potențialul enzimatic, specificitatea pentru substrat și condițiile fizico-chimice de cultivare.
4. Hidroliza grăsimilor din palmier, cocos și shea, condusă *in situ* se desfășoară optim la temperatura de 25°C și a_w 0,98, viteza de hidroliză fiind încetinită prin reducerea temperaturii și a activității apei, corelat cu creșterea concentrației de sare în mediu.
5. Tulpina *Yarrowia lipolytica* R013 s-a evidențiat prin superioritatea potențialului de a produce lipaze extracelulare capabile să producă hidroliza în fază solidă, cu randamente sporite, a celor trei grăsimi studiate (palmier, cocos și shea), chiar și în condiții restrictive de mediu (temperatura de 4°C și a_w 0,96 și 0,93).
6. Valoarea științifică și aplicativă a studiilor realizate derivă din datele obținute cu importanță pentru identificarea agenților și a condițiilor biotehnologice pentru hidroliza grăsimilor, în condiții simple și eficiente din punct de vedere economic, în vederea obținerii de acizi grași cu rol de bioconservați.
7. Grăsimile de palmier, cocos și shea pot fi hidrolizate prin activitatea metabolică a drojdiilor *Yarrowia lipolytica*, prin cultivare în sistem staționar pe mediu solid îmbogățit în grăsimi.
8. Studiile prezintă importanță fundamentală și aplicativă fiind originale deoarece sunt în premieră conduse în această manieră, cu impact deosebit în stabilirea a noi procedee simple și moderne de asigurare a conservabilității alimentelor și a siguranței alimentare.

6. Caracterizarea hidrolizatelor grăsimilor tropicale, identificarea și cuantificarea acizilor grași cu potențial antimicrobian

În prezentul studiu s-a urmărit caracterizarea compoziției chimice a hidrolizatelor enzimatică din grăsimi tropicale (palmier, cocos și shea), obținute prin hidroliza enzimatică în fază solidă cu tulpina selecționată *Yarrowia lipolytica* R013, în vederea evidențierii prezenței acizilor grași cu potențial antimicrobian și a cuantificării concentrației eliberate prin hidroliză enzimatică, în condiții simple și eficiente de procesare (temperatura de 25°C, aw 0,98).

6.2 Materiale și metode

6.2.1 Reactivi, materiale și echipamente

▪ Grăsimi tropicale în stare brută

Grăsimea din palmier (din pulpa și sâmburii fructelor de palmier), grăsime de shea și grăsime de cocos, obținute prin metode tradiționale de extracție, achiziționate din Cameroun, Africa.

▪ Reactivi

Solvenți pentru extracția acizilor grași (AGL): Na₂SO₄, H₂SO₄, eter etilic și heptan (Sigma–Aldrich, Germania). Diazometan și hidroxid de potasiu (soluție în metanol) pentru derivatizarea acizilor grași și obținerea esterilor metilici. Pentru extracția esterilor metilici ai acizilor grași s-au utilizat coloane NH₂ (Merck), acid formic și eter etilic (Sigma –Aldrich, Germania).

▪ Tulpina de drojdie *Yarrowia lipolytica* R013

Cultivarea tulpinii de *Yarrowia lipolytica* R013 s-a realizat conform protocolului de lucru descris în subcapitolul 5.2.2.

6.2.2 Metode de investigare, analiză și interpretare a datelor experimentale

6.2.2.1 Hidroliza în fază solidă a grăsimilor de palmier, cocos și shea cu drojdia *Yarrowia lipolytica*

Hidroliza grăsimilor a fost realizată *in situ*, prin cultivarea drojdiei selecționate *Yarrowia lipolytica* R013 pe mediu solid (Sabouraud agar), steril, în care s-a înglobat grăsimea testată (3%) și s-a repatizat în plăci Petri sterile.

Procedeele de lucru au fost adaptate după metode similare descrise în literatura de specialitate (Frank & Bullerman, 1993). Întrucât s-au utilizat grăsimile în stare brută, pentru a limita contaminarea, în mediul de cultură s-au adăugat 200 ppm de cloramfenicol. Pentru a asigura nivelul optim de activitate al apei în mediu (a_w 0,98) s-au adăugat 3 g L⁻¹ NaCl. La suprafața mediului s-a etalat prin răspândire uniformă câte 1 mL de inocul de drojdie cu o concentrație 10⁶ ufc mL⁻¹. Hidroliza enzimatică a grăsimilor s-a realizat *in situ* la interfața dintre faza apoasă reprezentată de suspensia de celule de drojdie (inocul), care produc lipaza extracelulară și faza grasă (substratul) etalată la suprafața mediului de cultură (figura 6.1). Probele au fost menținute la temperatura de 25°C, timp de 7 zile. La intervale de 3 zile și 7 zile au fost prelevate probe pentru analiza chimică a conținutului și tipului de acizi grași eliberați prin hidroliză. Pentru comparație, s-au folosit probe martor obținute în condiții similare, care nu au fost inoculate cu celulele de drojdie. Până în momentul analizelor, probele au fost păstrate în recipiente sterile la temperatura de -18°C.

6.2.2.2 Extracția acizilor grași

Pentru a evidenția profilul total al acizilor grași, fiecare grăsime a fost hidrolizată chimic (în prezența KOH 2N metanolic și 1mL hexan) (Graff, 1990). Astfel, s-au urmărit proporționalitatea acizilor grași eliberați prin hidroliza chimică (în scop analitic), comparativ cu proporționalitatea acizilor grași eliberați în urma hidrolizei enzimatică a grăsimilor tropicale. Prin acizi grași liberi (AGL) s-au considerat în acest studiu acizii grași prezenți inițial în substrat și acizii grași eliberați în urma hidrolizei enzimatică a grăsimilor testate. În urma hidrolizei grăsimilor testate s-au obținut hidrolizate conținând un amestec complex de acizi grași saturați și nesaturați. Pentru extracția acizilor grași s-a utilizat o metodă de extracție adaptată după Hiroyuki (1992). Identificarea și cuantificarea acizilor grași s-a realizat prin gaz-cromatografie. Conținutul în acizi grași extrași a fost raportat la conținutul total de acizi grași din fiecare amestec, exprimat în procente.

6.2.2.3 Derivatizarea acizilor grași

Pentru analiza gaz-cromatografică, acizii grași au fost metilați în vederea obținerii esterilor metilici ai acestora. Obținerea esterilor metilici ai acizilor grași s-a realizat prin derivatizare în prezența diazometanului (Hartman, 1973). Fiecare probă

păstrată în hexan a fost prelucrată în curent de azot în scopul eliminării solventului. După uscarea probelor s-au adăugat 4-5 picături de diazometan, în prezența căruia s-au observat apariția bulelor de gaz. Acest aspect a condus la confirmarea reacției de metilare incomplete a acizilor grași (Boer, 1963). Derivatizarea a continuat până în momentul în care nu s-a mai observat efervescenta amestecului, semn care a confirmat faptul că reacția de metilare a fost finalizată (Dalglish, 1966).

6.2.4 Identificarea și cuantificarea acizilor grași prin gaz - cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă

Separarea și identificarea esterilor metilici ai acizilor grași s-a realizat prin utilizarea gaz-cromatografului Agilent Technologies 6890N cuplat cu spectrometru de masă HP 5973 (Palo Alto, CA, US). Inițial, temperatura a fost menținută la 120 °C, timp de 5 minute, după care aceasta a atins valoarea de 215°C, cu o viteză de creștere de 3°C min⁻¹, apoi aceasta a crescut de la 215°C la 225°C, cu o viteză de 0,5°C minut⁻¹ (Kouhei, 2008). Temperatura injectorului și a detectorului a fost menținută la 250°C. Faza mobilă a fost reprezentată de heliu, care a circulat cu viteza de 1mL min⁻¹, având un coeficient de separare de 1:10. Câte 1 mL din fiecare probă de analizat a fost transferat într-un tub Eppendorf peste care s-a adăugat o concentrație de 50 ppm de standard intern (C11:0) Met 99% (Meier & Joensen, 2006). Probele de analizat au fost injectate cu ajutorul unei microsiringi, iar volumul de injectare a fost 1μL. Acizii grași au fost identificați prin compararea timpului de retenție al acestora cu cel al standardului C11:0 Met 99% (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) (Shantha & Napolitano, 1992). Conținutul acizilor grași a fost exprimat în procente. Concentrația procentuală a fiecărui acid gras s-a calculat prin raportul dintre aria fiecărui pic și suma tuturor ariilor picurilor corespunzătoare acizilor grași din amestecul analizat.

6.2.5. Metode de analiză statistică și interpretare a datelor experimentale

Experimentele au fost efectuate în triplicat, iar datele prezentate reprezintă medie a celor trei determinări. Datele au analizate statistic prin analiza de varianță (ANOVA), testul Duncan folosind programul de calcul SPSS (versiunea 10). Diferențele cu $p < 0,05$ au fost considerate semnificative.

6.3 Rezultate și discuții

6.3.1 Studiul variabilității conținutului în acizi grași în grăsimi și hidrolizate din grăsimi tropicale (palmier, cocos și shea)

6.3.1.1 Evaluarea conținutului de acizi grași din grăsimea și hidrolizatul grăsimii de palmier

Din grăsimea extrasă din pulpa fructelor de palmier în stare brută, s-au extras 23,50 % acizi grași liberi (AGL). După 3 zile de hidroliză enzimatică, în hidrolizatului grăsimii de palmier s-a eliberat un conținut cu 21,32% mai mare, comparativ cu grăsimea brută, iar după 7 zile, concentrația de acizi grași liberi a crescut semnificativ până la 68,55 %. Rezultatele demonstrează că hidroliza enzimatică a grăsimii de palmier avansează proporțional cu timpul de hidroliză, încât un interval de 7 zile poate asigura obținerea unui randament superior de acizi grași și este o perioadă echilibrată din punctul de vedere al eficienței economice a procesului.

Din grăsimea sâmburilor fructelor de palmier în stare brută, s-a extras un conținut de 4,21 % acizi grași liberi, restul de 95,79 % au reprezentat acizii grași esterificați (AGE) legați de componentele lipidice ale grăsimii (figura 6.3).

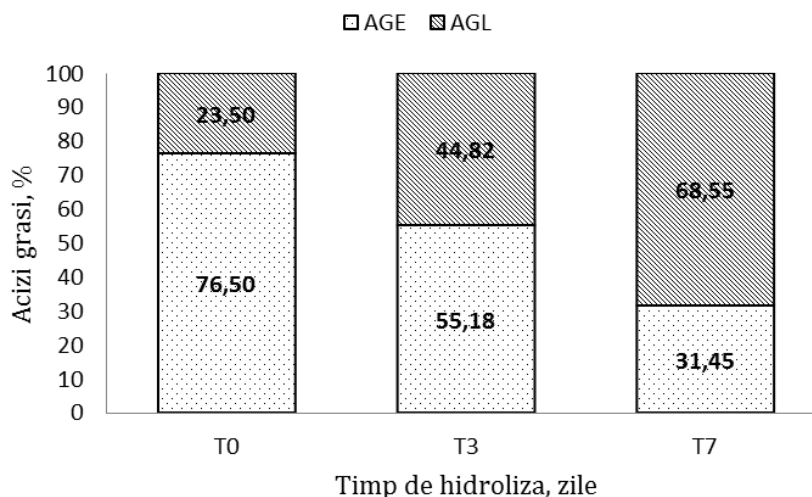


Figura 6.2 Conținutul de acizi grași liberi (AGL) și esterificați (AGE) în grăsimea din pulpa fructelor de palmier în stare brută (T0) și în hidrolizatele enzimatică, după 3 zile (T3) și 7 zile (T7) de acțiune a drojdiei *Yarrowia lipolytica* (hidroliza *in situ*, temperatura de 25°C, aw 0,98)

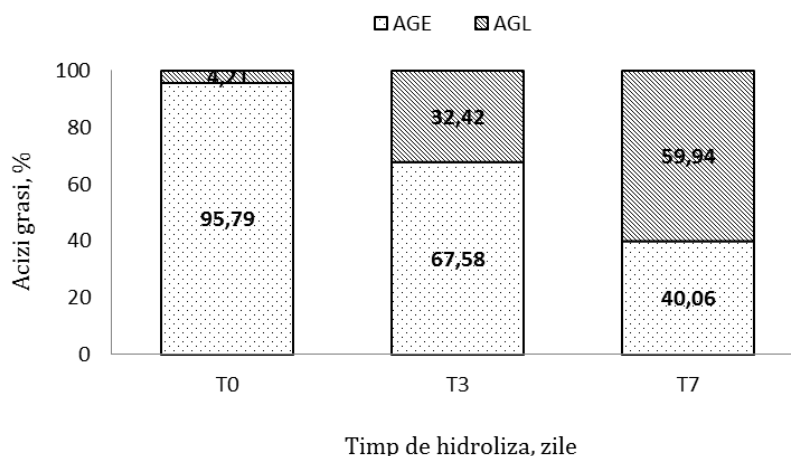


Figura 6.3 Conținutul de acizi grași liberi (AGL) și esterificați (AGE) în grăsimea din sâmburii fructelor de palmier în stare brută (T0) și în hidrolizatele enzimatice, după 3 zile (T3) și 7 zile (T7) de acțiune a drojdiei *Yarrowia lipolytica* (hidroliza *in situ*, temperatura de 25°C, aw 0,98)

6.3.1.2 Evaluarea conținutului în acizi grași din grăsimea și a hidrolizatului grăsimii de cocos

În ceea ce privește conținutul de acizi grași din grăsimea de cocos brută (T0), s-a evidențiat un procent de 0,74% acizi grași liberi, iar restul de 99,26 % au reprezentat acizii grași esterificați (AGE) din conținutul mono-, di-, și trigliceridelor.

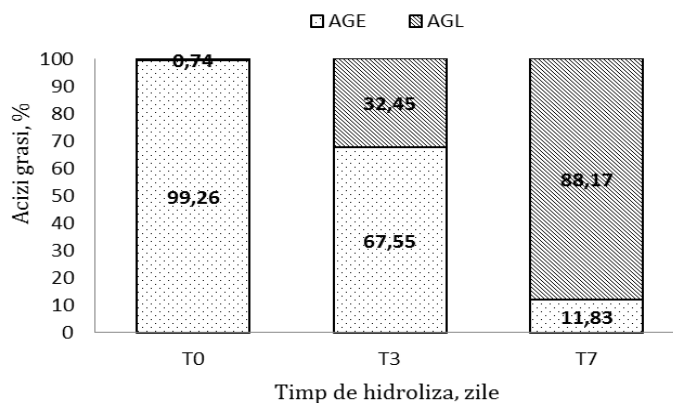


Figura 6.4 Conținutul de acizi grași liberi (AGL) și esterificați (AGE) în grăsimea de cocos în stare brută (T0) și în hidrolizatele enzimatice, după 3 zile (T3) și 7 zile (T7) de acțiune a drojdiei *Yarrowia lipolytica* (hidroliza *in situ*, temperatura de 25°C, aw 0,98)

După hidroliza enzimatică a grăsimii de cocos, timp de 3 zile (T3), s-a observat o creștere semnificativă a conținutului de acizi grași liberi, respectiv cu 31,71 %, comparativ cu grăsimea în stare brută.

După 7 zile, conținutul de acizi grași eliberați în hidrolizat a crescut cu 50 %, comparativ cu hidrolizatul obținut după 3 zile, și cu 80%, comparativ cu grăsimea în stare brută (figura 6.4).

6.3.1.3 Evaluarea conținutului de acizi grași din grăsimea și hidrolizatul grăsimii de shea

Grăsimea de shea furnizează un conținut sporit de acizi grași liberi prin hidroliza enzimatică. Pornind de la un conținut de 14,94 % acizi grași liberi, în grăsimea brută, după 3 zile de hidroliză, conținutul de acizi grași liberi a crescut cu 24,16 %, iar după 7 zile a crescut cu 43,10% (figura 6.5).

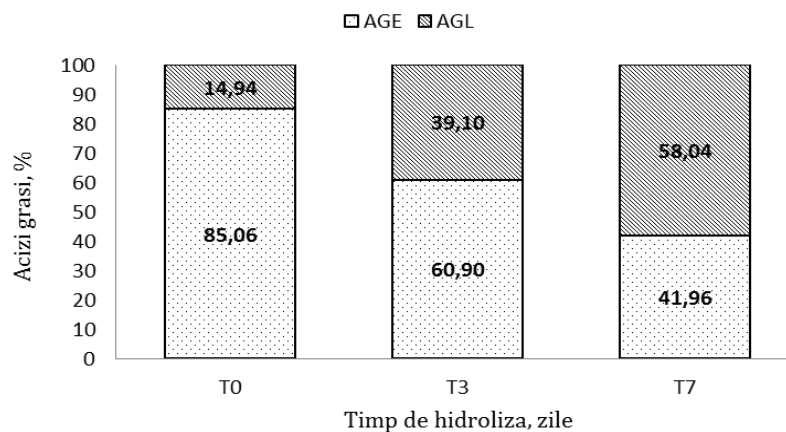


Figura 6.5 Conținutul de acizi grași liberi (AGL) și esterificați (AGE) în grăsimea de shea în stare brută (T0) și în hidrolizatele enzimatiche, după 3 zile (T3) și 7 zile (T7) de acțiune a drojdiei *Yarrowia lipolytica* (hidroliza *in situ*, temperatura de 25°C, aw 0,98)

Pe baza rezultatelor obținute, se consideră că un timp de hidroliză enzimatică *in situ* de 7 zile constituie o variantă convenabilă pentru eliberarea cu randamente sporite a acizilor grași din grăsimile tropicale.

6.3.2 Cuantificarea și identificarea acizilor grași cu potențial antimicrobian din grăsimi și hidrolizate de grăsimi tropicale

În ceea ce privește grăsimea de palmier, rezultatele acestui studiu au permis identificarea conținutului de acizi grași din uleiurile de palmier, care au prezentat variabilitate atât din punct de vedere calitativ cât și din punct de vedere cantitativ. Pentru evaluarea conținutului de acizi grași eliberați în urma hidrolizei enzimatiche a fost necesară identificarea conținutului acizilor grași obținut prin hidroliză chimică.

Studiul comparativ dintre conținutul acizilor grași eliberați prin hidroliză enzimatică și cel al acizilor grași hidrolizați chimic, poate demonstra că hidroliza enzimatică reprezintă o metodă alternativă eficientă care vizează eliberarea cu randamente superioare, a acizilor grași cu potențial antimicrobian.

6.3.2.1. Acizii grași cu potențial antimicrobian în grăsimea și hidrolizatul enzimatic din grăsimea de palmier

Caracterizarea compoziției în acizi grași din grăsimea extrasă din pulpa fructelor de palmier și respectiv hidrolizatul enzimatic derivat din această substrat a relevat existența în compoziția grăsimii nehidrolizate a unui conținut ridicat de acizi grași saturați, precum: 39,26% acid palmitic (C16:0), 6,70% acid stearic (C18:0) și acizi grași nesaturați, precum: 6,23% acid linoleic (C18:2), 43,47% acid oleic (C18:1) (figura 6.6). Alți acizi grași cu catenă medie, precum acidul lauric (C12:0), cunoscuți pentru potențialul antimicrobian, au fost evidențiați în cantități foarte reduse (figura 6.6).

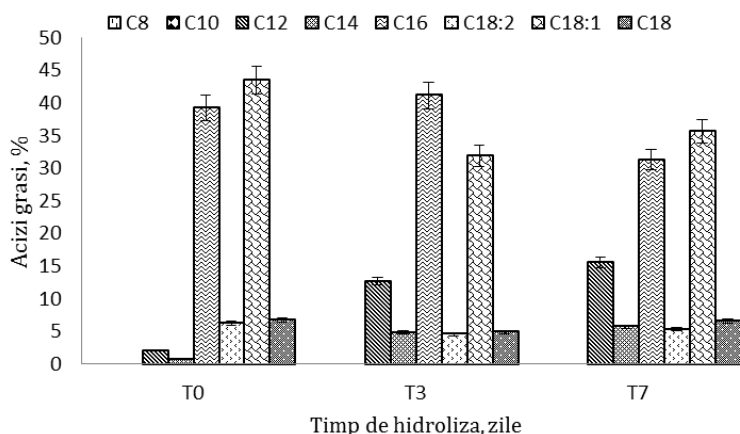


Figura 6.6 Compoziția în acizi grași în grăsimea extrasă din pulpa fructelor de palmier și în hidrolizatele enzimatică *in situ* cu *Yarrowia lipolytica*, după 3 zile (T3) și 7 zile (T7) (temperatura de 25°C, aw 0,98)

După 7 zile, din grăsimea din pulpa fructelor de palmier s-au eliberat prin hidroliză enzimatică cantități importante de acizi grași, precum: acidul palmitic (31,27%), acidul oleic (35,66%), acidul linoleic (5,35%), și acidul stearic (6,53%).

Aceste date certifică utilizarea uleiului de palmier ca sursă importantă de acizi grași cu activitate antimicrobiană, precum potențialul tulpinii selecționate *Yarrowia*

lipolytica R013 de a produce hidroliza avansată a acestui substrat, în condiții controlate de cultivare în sistem SSF.

Prin analiza comparativă a profilului de acizi grași eliberați în urma hidrolizei chimice și respectiv enzimatic, s-a observat că în hidrolizatul enzimatic se eliberează proporții ridicate de acizi grași cu catenă medie comparativ cu tratamentul chimic (figura 6.7). De exemplu, în hidrolizatul chimic sunt eliberate proporții reduse de acid lauric (1%) și acid miristic (1%) și proporții ridicate de acid palmitic (72%), linoleic (12%) și oleic (11%). În hidrolizatul enzimatic se observă o creștere semnificativă a acizilor grași, importanți pentru rolul lor antimicrobian, precum: acidul lauric (16%), acidul miristic (6%). Se observă că în urma hidrolizei enzimatic gradul de eliberare al acizilor grași cu catenă medie este mai ridicat față de cel din cadrul hidrolizei chimice (figura 6.7).

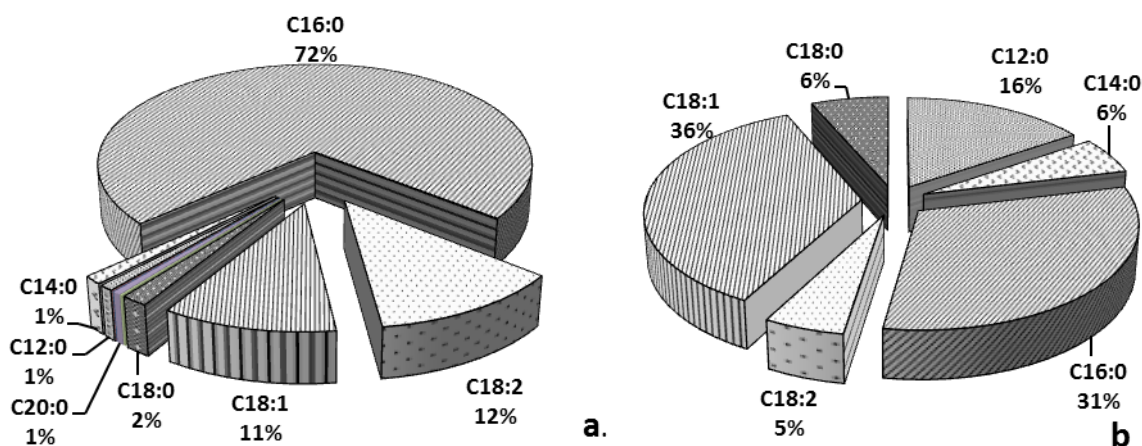


Figura 6.7 Profilul acizilor grași din compoziția grăsimii din pulpa fructelor de palmier, obținut în urma: **a**- hidrolizei chimice, **b**- hidrolizei enzimatic

Rezultatele obținute sunt în acord cu studiile realizate de Kohlwein & Paltauf, 1983, prin care s-a demonstrat că lipazele din *Yarrowia lipolytica* prezintă o specificitate ridicată pentru lipidele ce conțin acizii grași cu 12, 14, 16 și 18 atomi de carbon, fie saturați, fie nesaturați, contribuind substanțial la eliberarea acestora. Totodată, s-a demonstrat că activitatea lipolitică a acestei enzime este specifică pentru grupările esterice din pozițiile 1 și 3 ale acilglicerolilor (Kohlwein & Paltauf, 1983).

Dacă în grăsimea extrasă din pulpa fructelor de palmier s-au evidențiat acizi grași saturați cu catenă lungă, și respectiv cei nesaturați, în grăsimea extrasă din sâmburii fructelor de palmier au fost evidențiați acizi grași saturați cu catenă medie. Astfel, în

grăsimea sâmburilor de palmier au fost identificați acizii grași saturați cu catenă medie, precum: acidul lauric (20%), acidul miristic (25%), acidul capric (4,6%) și acidul caprilic (6,6%) (figura 6.8).

Datorită specificității lipolitice ridicate a drojdiei pentru grăsimea din sâmburii de palmier, după șapte zile de hidroliză, în hidrolizat s-au identificat preponderent acid lauric (44,4%) și acidul miristic (38,3%), ambii fiind cunoscuți ca exercitând activitate antimicrobiană. Aceste date sunt în concordanță cu literatura de specialitate (Siew, 2000, Mbandi *et al.*, 2004).

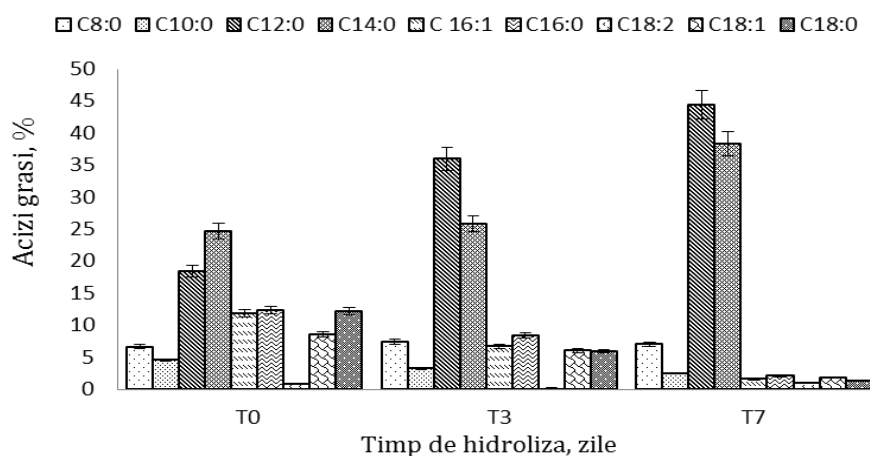


Figura 6.8 Compoziția în acizi grași totali în grăsimea extrasă din sâmburii fructelor de palmier și în hidrolizatele enzimatice *in situ* cu *Yarrowia lipolytica* RO13, după 3 zile (T3) și 7 zile (T7) (temperatura de 25°C, aw 0,98)

Prin studiul comparativ al conținutului acizilor grași din hidrolizatul chimic și enzimatic al grăsimii din sâmburii fructelor de palmier, s-au evidențiat următoarele aspecte: în hidrolizatul chimic s-au identificat concentrații ridicate de acid lauric (38%), acid miristic (16%), acidul palmitic (12%) și acidul oleic (13%), pe când în hidrolizatul enzimatic este evidentă eliberarea acidului lauric (C12:0) și respectiv acid miristic (C14:0) care ating concentrații de 44% și respectiv 38%.

Din punct de vedere al gradului de eliberare a acizilor grași prin cele două tipuri de tratamente de hidroliză, se observă că hidroliza enzimatică prezintă un grad comparabil de eficiență cu hidroliza chimică, în ceea ce privește randamentul de hidroliză, însă se diferențiază substanțial prin spectrul acizilor grași eliberați, accentuând însă eliberarea acizilor grași saturați cu catenă medie, precum: acidul lauric (C12:0), acidul miristic (C14:0), acidul palmitic (C16:0).

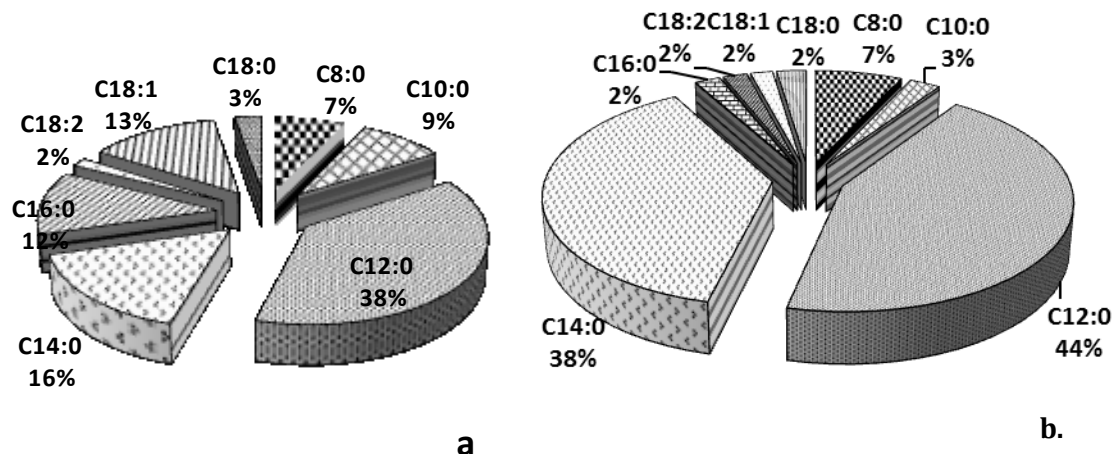


Figura 6.9 Profilul acizilor grași din compoziția grăsimii din sămburii fructelor de palmier, eliberați prin : **a-** hidroliză chimică; **b-** hidroliză enzimatică

Aceste rezultate au fost demonstrate și prin studiile întreprinse de Kohlwein și Paltauf (1983), care au demonstrat capacitatea lipazei din *Yarrowia lipolytica*, de a elibera acizii grași, precum: acidul lauric (C12:0) și acidul miristic (C14:0), legați în pozițiile 1 și 3 al acilglicerolilor.

6.3.2.2 Acizii grași cu potențial antimicrobian în grăsimea și hidrolizatul enzimatic din grăsimea de cocos

În grăsimea de cocos nehidrolizată au fost identificate concentrații ridicate de acizi grași saturați, după cum urmează: acidul lauric (14%), acidul miristic (21%), acidul palmitic (17%), acidul stearic (19%) și concentrații moderate de acizi grași nesaturați, precum: acidul palmitoleic (11%), acidul linoleic (6%) și acidul oleic (9%)(figura 6.10).

Profilul total al acizilor grași rezultați în urma hidrolizei chimice a grăsimii de cocos a fost constituit din: 7% acid caprilic (C8:0), 7% acid capric (C10:0), 52% acid lauric (C12:0), 13% acid miristic (C14:0), 9% acid palmitic (C16:0), 4% acid linoleic (C18:2), 5% acid oleic (C18:1) și 3% acid stearic (C18:0) (figura 6.11).

În urma hidrolizei enzimatice desfășurate *in situ* cu tulpina de drojdie *Yarrowia lipolytica* RO13, la temperatura de 25°C și aw 0,98, compoziția hidrolizatului de cocos a fost îmbogățită cu concentrații semnificative de acizi grași saturați cu catenă medie. Astfel, în hidrolizatului enzimatic al grăsimii de cocos, concentrația acidului miristic (C14:0) crește de 3 ori comparativ cu compoziția în hidrolizatului chimic.

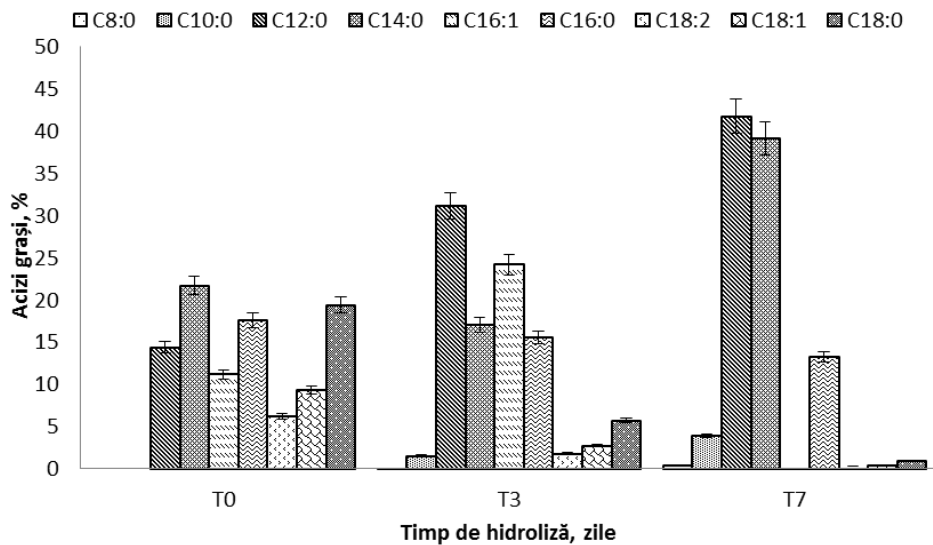


Figura 6.10 Profilul acizilor grași din compoziția grăsimii din cocos și respectiv din hidrolizatele obținute în urma hidrolizei enzimaticice *in situ* cu drojdia *Yarrowia lipolytica* RO13, după 3 și 7 zile

Concentrația acidului lauric (C12:0) s-a redus cu 11%, iar concentrația acidului palmitic (C16:0) a crescut cu 4%, din totalul acizilor grași din compoziția hidrolizatului enzimatic, comparativ cu hidrolizatului obținut prin tratament chimic.

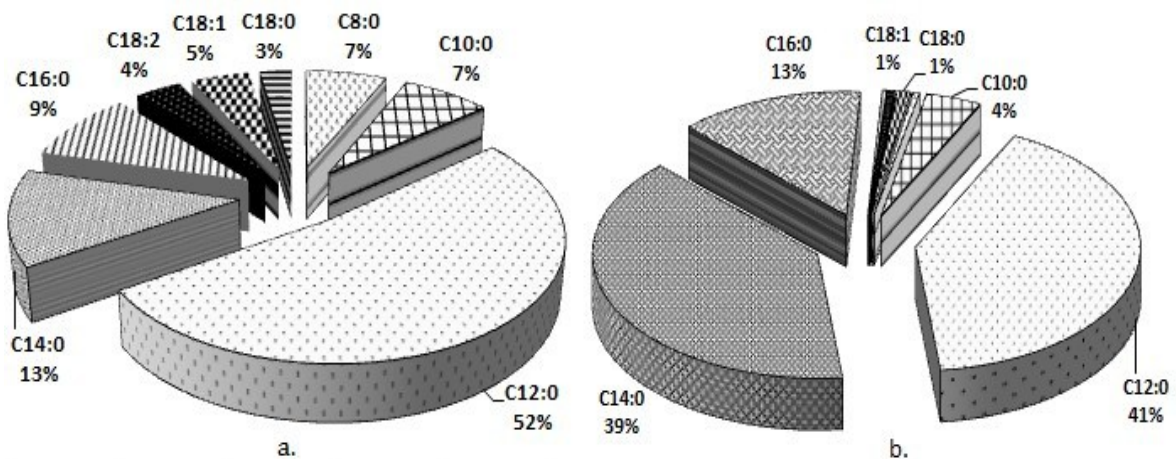


Figura 6.11 Profilul acizilor grași din compoziția grăsimii din cocos după hidroliză: a- chimică, b- enzimatică

6.3.2.3 Acizii grași cu potențial antimicrobian în grăsimea și hidrolizatului enzimatic din grăsimea de shea

În compoziția grăsimii de shea în stare brută, ca acizi grași predominanți s-au evidențiat cei saturați cu catenă lungă, 31,5% acid stearic (C18:0), 24,3% acid palmitic (C16:0), acizii grași monosaturați, dintre care 39,7% acid oleic (C18:1) și

acizi grași polinesaturați, dintre care 1,8% acid linoleic (C18:2). Grăsimea de shea în stare brută conține urme de acizi grași saturați cu catenă medie, după cum urmează: Așa cum se poate observa din figura 6.12, în hidrolizatul de shea obținut după șapte zile de hidroliză, profilul acizilor grași se modifică considerabil, astfel încât proporția acizilor grași nesaturați scade odată cu creșterea proporției acizilor grași saturați cu catenă medie. Se observă faptul că gradul de eliberare al acizilor grași saturați cu catenă medie crește cu 7% pentru acidul lauric (C12:0) și cu 5% pentru acidul miristic (C14:0). În hidrolizat s-au identificat concentrații superioare de acid oleic (31,2%), acid stearic (20,7%) și acid palmitic (17,5%).

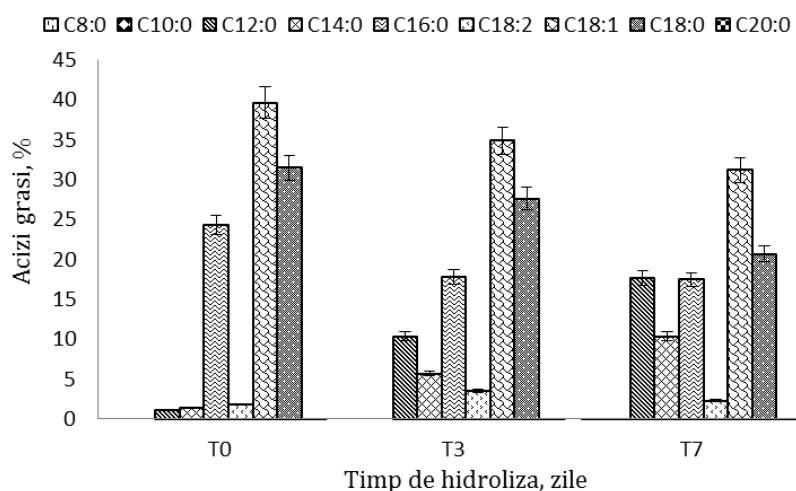


Figura 6.12 Dinamica de eliberare a acizilor grași din compoziția grăsimii din shea prin hidroliza enzimatică *in situ* cu drojdia *Yarrowia lipolytica* RO13, după 3 și 7 zile

Un aspect important îl constituie faptul că, la sfârșitul perioadei de hidroliză, în extract s-a evidențiat prezența acizilor lauric (17,7%) și respectiv miristic (10,4%), care inițial au fost prezenți în proporții reduse, în compoziția grăsimii de shea în stare brută.

Prin analiza comparativă a profilului acizilor grași rezultați în urma hidrolizei enzimatică și chimice, s-au evidențiat următoarele aspecte:

- Prin hidroliza chimică se eliberează un conținut ridicat de acizi grași nesaturați, iar acizii grași saturați cu catenă medie se regăsesc în proporții reduse.

- Prin hidroliza enzimatică a grăsimii de shea se eliberează un procent ridicat de acizii grași saturați cu catenă medie, care schimbă considerabil profilul compozițional.

Acțiunea hidrolitică *in situ* a drojdiei *Yarrowia lipolytica* RO13 este eficientă pentru hidroliza grăsimii de shea, după 7 zile, când se observă creșterea substanțială a concentrațiilor de acid lauric (17,7%) și acid miristic (10,4%), acizi grași cu potențial antimicrobian (figura 6.13).

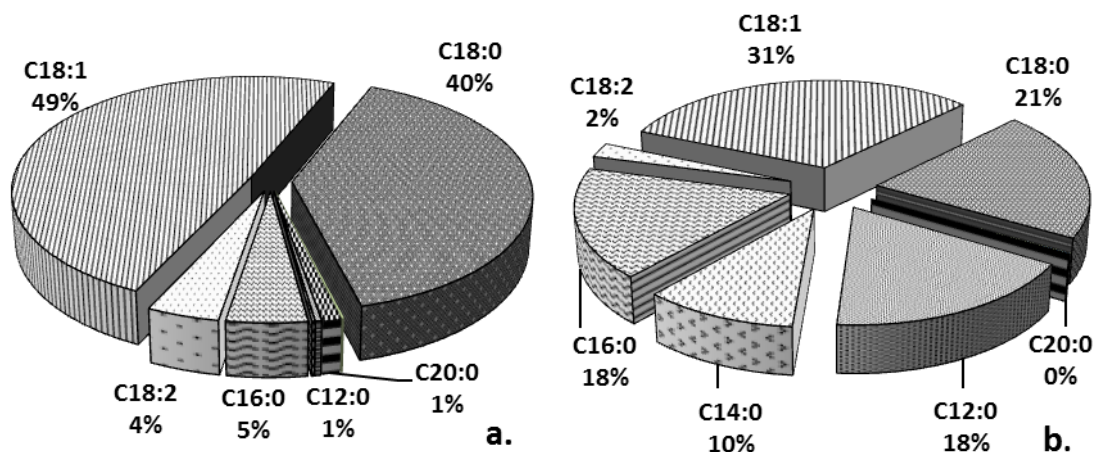


Figura 6.13 Profilul acizilor grași în hidrolizate din grăsimi de shea obținute prin **a-** hidroliza chimică; **b-** hidroliza enzimatică

Așa cum se poate observa din cromatograme (Anexa 4) în extractul obținut din hidrolizatului enzimatic al grăsimii de shea, după 7 zile, se reduce proporția de acid oleic și acid stearic cu 18% și respectiv 20%, comparativ cu compoziția hidrolizatului chimic.

6.4 Concluzii parțiale

1. S-a studiat compoziția în acizi grași din grăsimile tropicale și modificarea profilului compozițional prin transformarea acestora sub acțiunea hidrolitică *in situ* a drojdiei selecționate *Yarrowia lipolytica* RO13, prin cultivare în fază solidă, la temperatura de 25°C și activitatea apei 0,98, după 3 și 7 zile de cultivare în sistem staționar.
2. S-a evidențiat potențialul grăsimilor din palmier, cocos și shea ca surse importante de acizi grași saturați cu catenă medie și lungă, recunoscuți pentru activitatea antimicrobiană, precum acidul caprilic, acidul capric, acidul lauric, acidul miristic, palmitic.
3. Studiile au confirmat eficiența tratamentului enzimatic condus *in situ* asupra eliberării acizilor grași cu potențial antimicrobian, gradul cel mai eficient de eliberare a acizilor grași obținându-se după 7 zile de cultivare a drojdiei în sistem staționar, la temperatura de 25°C și activitatea apei 0,98.
4. Rezultatele obținute prezintă importanță de cercetare fundamentală și aplicativă, întrucât oferă date originale privind compoziția în acizi grași a grăsimilor tropicale studiate, în stare brută și în hidrolizatele obținute în condiții neconvenționale de hidroliză enzimatică.

7. Testarea activității antimicrobiene a extractelor conținând acizi grași liberi asupra unor bacterii cu potențial patogen

În acord cu cele mai noi tendințe moderne în identificarea de noi compuși cu potențial bioconservant, în prezentul studiu s-a evaluat activitatea antimicrobiană a extractelor conținând acizi grași liberi și esterificați obținute prin hidroliza enzimatică în fază solidă, cu tulpina selecționată de drojdie *Yarrowia lipolytica* R013, față de unele bacterii cu potențial patogen, cu incidență în industria alimentară. .

7.2 Materiale și metode

7.2.1 Reactivi, medii de cultură și microorganisme

▪ Medii de cultură și reactivi

- Mediul Sabouraud lichid (Sigma Aldrich, Germania), pentru obținerea inoculului de drojdie *Yarrowia lipolytica* RO 13.
- Mediul BHI („brain heart infusion”)(Sigma Aldrich, Germania), pentru cultivarea bacteriilor cu potențial patogen.
- Dimetilsulfoxid (DMSO)(Sigma–Aldrich, Germania), pentru solubilizarea fazei solide în care s-a produs lipoliza.

▪ Materiale

- Extracte conținând acizi grași liberi și acizi grași, din hidrolizate ale grăsimilor din palmier (fulpă fructe și sâmburi), cocos și shea, obținute prin hidroliză în fază solidă cu tulpina selecționată de drojdie *Yarrowia lipolytica* R013, la temperatura de 25°C și aw 0,98.
- Microplăci sterile cu 96 de godeuri.

▪ Microorganisme

- Tulpina de drojdie** – *Yarrowia lipolytica* R013, pentru hidroliza enzimatică *in situ* a grăsimilor tropicale.
- Microorganisme indicator:** *Listeria monocytogenes* 56LY, *Salmonella* Enteritidis 15S, *Bacillus cereus* DSM10 și *Escherichia coli* 555, din colecția Universității din Bologna, Facultatea Scienze degli Alimenti, Cesena, Italia.

7.2.2 Metode de analiză și prelucrare a datelor experimentale

7.2.2.1 Reactivarea și obținerea inoculului de drojdie

Pentru reactivarea culturii și obținerea inoculului de drojdie s-a utilizat protocolul descris în subcapitolul 6.2.1.

7.2.2.2. Hidroliza enzimatică *in situ* și extracția acizilor grași liberi

Pentru hidroliza enzimatică a grăsimilor s-a utilizat protocolul de lucru descris în subcapitolul 6.2.2. Extracția acizilor grași s-a realizat în conformitate cu protocoalele descrise în subcapitolele 6.2.2.2 și 6.2.2.3.

Pentru solubilizarea extractelor s-a folosit soluție 20% DMSO. Concentrația extractului în soluția de DMSO a fost de 25 ppm pentru fiecare grăsime testată.

7.2.2.3. Multiplicarea bacteriilor test

Din culturile stoc s-au inoculat celule în mediul BHI lichid, steril (repartizat câte 8 mL, în eprubete), după care culturile s-au termostatat timp de 20 de ore, la temperatura de 37°C. Din fiecare cultură s-a inoculat apoi câte 1 mL de suspensie în altă eprubetă cu 8 mL de mediu BHI, steril. Culturile au fost termostatate la temperatura de 37°C, timp de 20 de ore, obținându-se o concentrație de celule de 10^6 ufc mL⁻¹.

7.2.2.4. Evaluarea activității antimicrobiene

Pentru evaluarea activității antimicrobiene a extractelor din hidrolizatele de grăsimi tropicale, conținând acizi grași liberi, s-au avut în vedere doi parametri: concentrația minimă inhibitorie (CMI) și concentrația minimă bactericidă (CMB), care s-au determinat folosind metoda recomandată de Ali-Shtayeh *et al.* (1997), cu unele modificări. În fiecare din cele 96 de godeuri din microplăci s-au adăugat câte 100 μL de mediu de cultură, BHI lichid, steril. În primele godeuri din prima coloană a microplăcii s-au adăugat 100 μL de extract conținând acizi grași (concentrația de 25 ppm hidrolizat enzimatic în 20% DMSO) din care s-au realizat diluții până la 10^{10} , astfel încât în fiecare godeu s-au obținut următoarele concentrații de extract conținând acizi grași : 25,0; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,09; și 0,04 ppm. Apoi, în fiecare godeu al microplacii au fost adăugați câte 100 μL de cultură test (10^6 ufc mL⁻¹ mediu). Pe microplacă, ultimele două coloane de godeuri au aparținut controlului pozitiv și respectiv controlului negativ. Controlul pozitiv a fost

reprezentat de 100 μ L de cultură test și respectiv 100 μ L mediu de cultură în absența extractului conținând acizii grași (agentului antimicrobian). Controlul negativ a fost reprezentat de câte 100 μ L din fiecare component: mediu de cultură, cultură test și soluție 20% DMSO (în absența extractului). Plăcile au fost termostatate la temperatura de 37°C, timp de 24 de ore.

Au fost considerate pozitive probele în care, s-a exercitat efectul inhibitor al extractutului, pentru o anumită concentrație de extract, când s-a constatat stoparea înmulțirii sau distrugerea bacteriilor test, prin analiza turbidității mediului sau pierderea viabilității celulelor, fapt demonstrat prin absența dezvoltării de colonii prin scarificarea din suspensie pe suprafața mediului cu agar și termostatare în condiții optime. *Concentrația minimă inhibitorie* reprezintă cea mai redusă cantitate de extract care inhibă complet dezvoltarea bacteriilor, iar *concentrația minimă bactericidă* reprezintă concentrația minimă de extract care determină distrugerea în totalitate a bacteriilor test din inocul.

7.2.2.5 Metode de analiză statistică și interpretare a datelor experimentale

Experimentele au fost efectuate în triplicat, iar datele prezentate reprezintă medie a celor trei determinări. Datele au analizate statistic prin analiza de varianță (ANOVA), testul Duncan folosind programul de calcul SPSS (versiunea 10). Diferențele cu $p < 0,05$ au fost considerate semnificative.

7.3 Rezultate și discuții

Pentru caracterizarea potențialului antimicrobian al hidrolizatelor din grăsimi tropicale (palmier, cocos și shea) s-a testat capacitatea inhibitorie a acizilor grași liberi și esterificați asupra a patru tulpini de bacterii test, cu potențial patogen, *Listeria monocytogenes* și *Bacillus cereus* (bacterii Gram-pozitive), *Salmonella* Enteritidis și *Escherichia coli* (bacterii Gram-negative), a extractelor de acizi grași.

7.3.1 Potențialul antibacterian al acizilor grași din grăsimea de palmier

7.3.1.1 Efectul antibacterian al acizilor grași eliberați prin hidroliză enzimatică din grăsimea din pulpa fructelor de palmier

Date privind efectul antibacterian al acizilor grași extrași din grăsimea în stare brută (AGL 0) și hidrolizatele enzimaticice obținute după 3 zile (AGL 3) și 7 zile (AGL 7) de

hidroliză în fază solidă cu drojdia *Yarrowia lipolytica* R013, sunt prezentate în figurile 7.1.

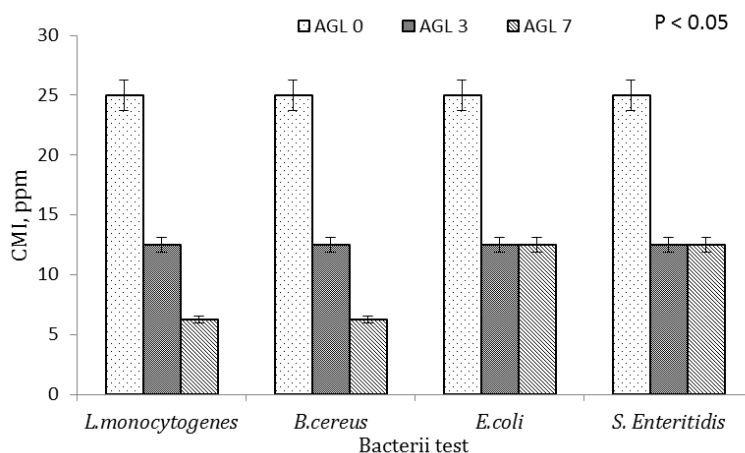


Figura 7.1 Concentrația minimă inhibitorie (CMI), asupra bacteriilor, a acizilor grași din extracte de grăsime din pulpa fructelor de palmier, în stare brută (AGL0) și după hidroliza enzimatică timp de 3 zile (AGL3) și 7 zile (AGL7)

În condițiile testate, nu s-a evidențiat un potențial antimicrobian semnificativ pentru acizi grași prezenți inițial în grăsimea brută. Aceste rezultate sunt corelate cu conținutul scăzut de acizi grași saturați cu catenă medie, responsabili pentru activitatea antimicrobiană, în compoziția grăsimii extrase din pulpa fructelor de palmier. Extractele din hidrolizate obținute după 3 zile și respectiv 7 zile de hidroliză enzimatică au inhibat bacteriile Gram pozitive și Gram negative cu concentrației minime de 12,5 ppm respectiv 6,25 ppm.

În ceea ce privește efectul acizilor grași liberi se constată dublarea efectului inhibitor în extractele obținute din grăsime hidrolizată enzimatic timp de 3 zile, iar în cazul bacteriilor *Listeria monocytogenes* și *Bacillus cereus*, concentrația minimă inhibitorie se diminuează la jumătate în cazul extractelor din hidrolizate după 7 zile.

Efectul inhibitor al extractelor vegetale asupra bacteriilor patogene s-a datorat conținutului ridicat de acizii grași saturați cu catenă medie eliberați în urma hidrolizei, acidul lauric (15,5%), acidul miristic (5,7%) și acidul palmitic (31,3%).

În ceea ce privește potențialul antibacterian al acizilor grași din extracte din grăsimea extrasă din sămburii de palmier, din datele prezentate în figura 7.2 se observă că CMI pentru acizii extrași din grăsimea nehidrolizată este nesemnificativă pentru bacteriile Gram – negative (*Escherichia coli* și *Salmonella Enteritidis*) și de 12,5 ppm pentru bacteriile Gram – pozitive (*Listeria monocytogenes* și *Bacillus cereus*).

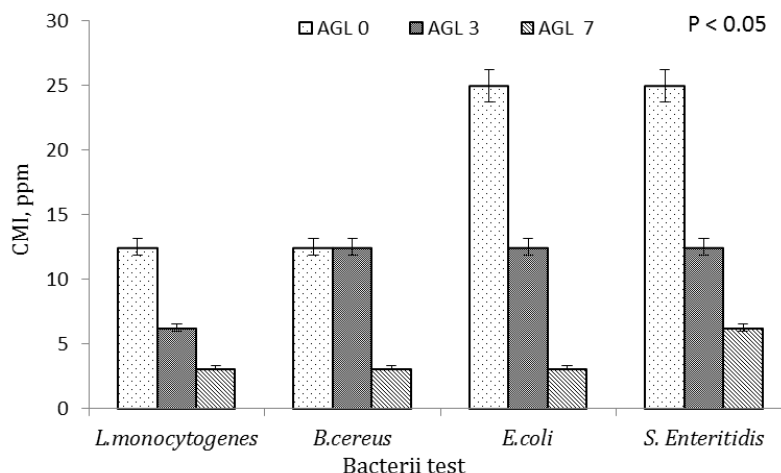


Figura 7.2 Capacitatea inhibitorie asupra bacteriilor a acizilor grași din extracte din grăsime din sâmburi de palmier, în stare brută (AGL0) și după hidroliza enzimatică, timp de 3 zile (AGL3) și 7 zile (AGL7)

Extractele de acizi grași obținute din hidrolizate ale grăsimii după 3 zile (AGL 3) și după 7 zile (AGL 7) diminuează substanțial dezvoltarea bacteriilor test, cu concentrații minime inhibitorii de 6,25 ppm și respectiv 3,12 ppm. Acest potențial este corelat desigur cu compoziția chimică a grăsimii din sâmburi de palmier și a hidrolizatelor enzimatic derivate, care se reflectă în puterea inhibitorie a extractelor.

7.3.1.2 Activitatea antibacteriană a acizilor grași din grăsimea de cocos

Concentrația minimă de inhibiție (CMI) a acizilor grași extrași din grăsime (AGL0) a fost de 12,5 ppm pentru bacteriile Gram-pozitive (*Listeria monocytogenes* și *Bacillus cereus*) și de 25 ppm pentru bacteriile Gram negative (*Escherichia coli* și *Salmonella Enteritidis*).

Analizând comparativ aceste rezultate cu puterea inhibitorie a grăsimii din palmier se observă că potențialul antimicrobian al acizilor grași din grăsimea din sâmburii fructelor de palmier este similar cu cel al acizilor grași din grăsimea de cocos.

Acizii grași din hidrolizatul enzimatic al grăsimii de cocos obținut după trei zile de hidroliză, prezintă concentrația minimă de inhibiție (CMI) de 6,25 ppm, pentru bacteriile Gram – pozitive și 12,5 ppm, pentru bacteriile Gram – negative. Însă, după șapte zile de hidroliză, extractul obținut este mult mai activ, concentrația minimă de inhibiție reducându-se de 2 ori pentru bacteriile *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* și *Salmonella Enteritidis*, și de 3 ori, pentru *Escherichia coli*.

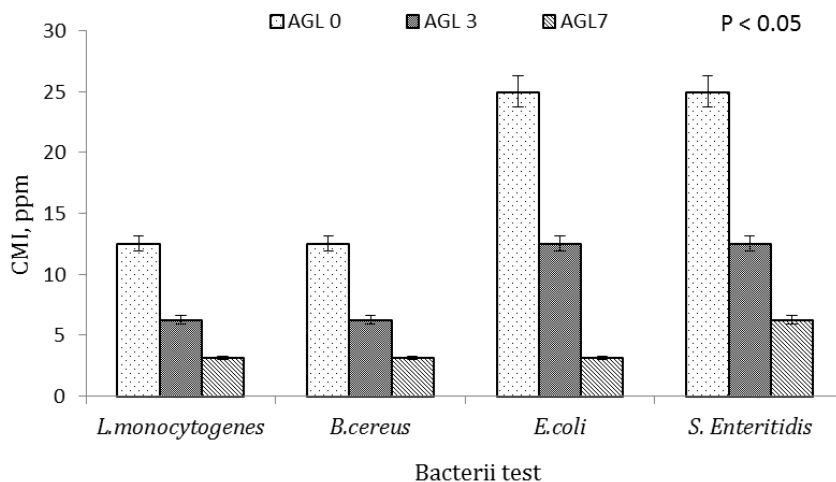


Figura 7.3 Capacitatea inhibitorie asupra bacteriilor a acizilor grași din extracte din grăsime de cocos, în stare brută (AGL0) și după hidroliza enzimatică timp de 3 zile (AGL3) și 7 zile (AGL7)

Rezultatele obținute sunt corelate cu conținutul de acizi grași cu rol antimicrobian din compoziția fiecărui extract (0, 3, 7 zile).

Astfel, o dată cu creșterea timpului de hidroliză, a concentrației de acizi grași cu potențial antimicrobian, crește semnificativ capacitatea inhibitorie a extractelor asupra bacteriilor potențial patogene studiate în calitate de microorganisme test (figura 7.3).

7.3.1.3 Potențialul inhibitor al acizilor grași din grăsimea de shea

În urma hidrolizei enzimatică, și în acest caz s-a observat că extractele obținute au fost îmbogățite un concentrații mari de acizi grași importanți din punct de vedere antimicrobian, ceea ce conduce la dublarea capacității inhibitorii (12,5 ppm), comportament care este direct corelat cu compoziția chimică a extractelor.

Capacitatea inhibitorie se amplifică direct proporțională cu timpul de hidroliză. Astfel, după 7 zile de hidroliză, extractele își potențează substanțial activitatea antibacteriană încât exercită efect bacteriostatic la o concentrație minimă de 6,25 ppm, pentru bacteriile Gram - negative (*Escherichia coli* și *Salmonella Enteritidis*) și de 3,12 ppm, pentru bacteriile Gram - pozitive (*Listeria monocytogenes* și *Bacillus cereus*) au fost inhibate cu o concentrație minimă.

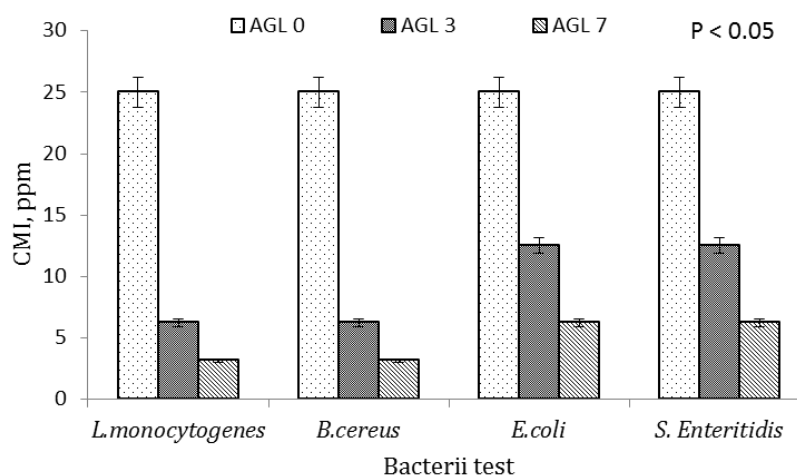


Figura 7.4 Capacitatea inhibitorie asupra bacteriilor a acizilor grași din extracte din grăsime de shea, în stare brută (AGL0) și după hidroliza enzimatică timp de 3 zile (AGL3) și 7 zile (AGL7)

Toate aceste rezultate au condus la orientarea studiilor și a aplicațiilor privind utilizarea surselor vegetale oleaginoase și nu numai, ca importante materii prime pentru obținerea de compuși bioconservanți.

7.3.2 Evaluarea potențialului bactericid al acizilor grași asupra bacteriilor patogene

În tabelul 7.2, sunt prezentate concentrațiile minime de inhibiție și bactericide ale extractelor grăsimilor tropicale împotriva bacteriilor patogene Gram – negative (*Escherichia coli* și *Salmonella Enteritidis*) și Gram – pozitive (*Listeria monocytogenes* și *Bacillus cereus*). Pentru acizii grași liberi prezenți în grăsimile tropicale analizate, concentrația minimă bactericidă este de 25 ppm pentru fiecare bacterie testată. Acest aspect a fost confirmat prin sterilitatea demonstrată prin cultivare pe medii cu agar a suspensiilor de bacterii în amestec cu extracte de acizi grași liberi, după 48 de ore de cultivare la temperatura de 37°C.

Extractele de acizi grași rezultați în urma hidrolizei enzimatice timp de trei zile, au avut o activitate bactericidă la concentrații mai ridicate, comparativ cu dozele pentru inhibiție. Astfel, acizii grași extrași din hidrolizatul grăsimii din sâmburii de palmier, cocos și shea au distrus bacteriile Gram – pozitive (*Listeria monocytogenes* și *Bacillus cereus*) cu o concentrație minimă de 6,25 ppm, iar bacteriile Gram – negative (*Escherichia coli* și *Salmonella Enteritidis*) care au fost distruse cu o concentrație minimă de 12,5 ppm, respectiv 25 ppm în cazul extractului grăsimii din pulpa

fructelor de palmier (tabelul 7.2). Acest comportament certifică rezistența sporită a bacteriilor Gram - negative față de acțiunea acizilor grași și labilitatea bacteriilor Gram - pozitive, care au o sensibilitate ridicată și pot fi inhibate și distruse la concentrații reduse de acizi grași.

Concentrația minimă bactericidă (CMB) a extractelor din hidrolizatele obținute după 7 zile de hidroliză a variat de la 3,12 ppm, pentru bacteriile Gram - pozitive și de 6,25 ppm, pentru bacteriile Gram - negative, în cazul hidrolizatelor din grăsimile de cocos și din sâmburii fructelor de palmier. Extractele de acizi grași rezultați în urma hidrolizei grăsimii din pulpa fructelor de palmier și respectiv shea au distrus bacteriile Gram - pozitive la concentrația minimă de 6,25 ppm, față de bacteriile Gram - negative care au necesitat o concentrație dublă de extract pentru obținerea efectului bactericid (tabelul 7.2).

7.3.3 Studiul comparativ al potențialului antimicrobian al acizilor grași din compoziția grăsimilor vegetale asupra bacteriilor patogene

S-a comparat activitatea antimicrobiană a hidrolizatelor din grăsimile tropicale cu puterea inhibitorie a unor antibiotice de referință.

Comparând aceste date cu potențialul antibacterian al hidrolizatelor din grăsimi tropicale se poate aprecia că grăsimea de cocos și cea din sâmburii fructelor de palmier reprezintă materii prime potențiale pentru obținerea bioconservanților naturali.

Din punct de vedere al efectului bactericid, se observă că amestecul de acizi grași liberi din hidrolizatele de grăsime de cocos și sâmburi de palmier are capacitatea de a distruge bacteriile Gram - pozitive la o concentrație minimă de 3,12 ppm, iar bacteriile Gram - negative, cu o concentrație de 6,25 ppm. Concentrația minimă bactericidă a extractelor din grăsimea de shea și cea din pulpa fructelor de palmier a fost de 6,25 ppm, pentru bacteriile Gram - pozitive, respectiv 12,5 ppm, pentru bacteriile Gram - negative.

Tabel 7.2 Concentrația minimă bactericidă a extractelor de acizi grași a grăsimilor vegetale și a hidrolizatorilor acestora obținute după 3 zile și 7 zile de hidroliză enzimatică *in situ* cu *Yarrowia lipolytica*, la temperatura de 25°C și aw 0,98

| Bacterii patogene | Grăsimea din sămburii fructelor de palmier | | | | | | Grăsimea de cocos | | | | | | Grăsimea din pulpa fructelor de palmier | | | | | | Grăsimea de shea | | | | | |
|-------------------------|--|------|------|-----------|------|------|-------------------|------|------|-----------|------|------|---|------|------|-----------|------|------|------------------|------|------|-----------|------|------|
| | CMI (ppm) | | | CMB (ppm) | | | CMI (ppm) | | | CMB (ppm) | | | CMI (ppm) | | | CMB (ppm) | | | CMI (ppm) | | | CMB (ppm) | | |
| | T0 | T3 | T7 | T0 | T3 | T7 | T0 | T3 | T7 | T0 | T3 | T7 | T0 | T3 | T7 | T0 | T3 | T7 | T0 | T3 | T7 | T0 | T3 | T7 |
| <i>L.monocytogens</i> | 12,5 | 6,25 | 3,12 | 25 | 6,25 | 3,12 | 12,5 | 6,25 | 3,12 | 25 | 6,25 | 3,12 | 25 | 12,5 | 6,25 | 25 | 12,5 | 6,25 | 25 | 6,25 | 3,12 | 25 | 6,25 | 6,25 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 12,5 | 6,25 | 3,12 | 25 | 6,25 | 3,12 | 12,5 | 6,25 | 3,12 | 25 | 6,25 | 3,12 | 25 | 12,5 | 6,25 | 25 | 12,5 | 6,25 | 25 | 6,25 | 3,12 | 25 | 6,25 | 6,25 |
| <i>Escherichia coli</i> | 25 | 6,25 | 3,12 | 25 | 12,5 | 6,25 | 25 | 12,5 | 3,12 | 25 | 12,5 | 6,25 | 25 | 12,5 | 12,5 | 25 | 25 | 12,5 | 25 | 12,5 | 6,25 | 25 | 12,5 | 12,5 |
| <i>S.Enteritidis</i> | 25 | 6,25 | 3,12 | 25 | 12,5 | 6,25 | 25 | 12,5 | 6,25 | 25 | 12,5 | 6,25 | 25 | 12,5 | 12,5 | 25 | 25 | 12,5 | 25 | 12,5 | 6,25 | 25 | 12,5 | 12,5 |

Deși comparând cu capacitatea inhibitorie a antibioticelor, amestecul de acizi grași liberi are o putere inhibitorie de cel puțin zece ori mai redusă, având în vedere procedeul simplu propus, prin care aceștia pot fi eliberați din grăsimi precum și posibilitatea de eliberare controlată și în sistem continuu sunt argumente care pledează pentru importanța acestor hidrolizate de grăsimi tropicale pentru utilizare în calitate de bioconservanți.

7.4 Concluzii parțiale

1. S-a studiat efectul bacteriostatic și bactericid al acizilor grași extrași din grăsimile de palmier, cocos și shea în stare brută și după hidroliza enzimatică, asupra bacteriilor Gram-pozitive, *Listeria monocytogenes* și *Bacillus cereus* și Gram-negative, *Escherichia coli* și *Salmonella Enteritidis*.
2. Acțiunea antimicrobiană a acizilor grași eliberați din hidroliza grăsimilor tropicale studiate este rezultatul efectului sinergic cumulativ determinat de totalitatea acizilor grași liberi prezenți în compoziția hidrolizatelor enzimatică, obținute după 3 zile și 7 zile de hidroliză enzimatică cu drojdia *Yarrowia lipolytica*, prin cultivare în fază solidă, la temperatura de 25°C și aw 0,98.
3. Hidrolizatele enzimatică derivate din grăsimea de cocos și din sâmburii fructelor de palmier au potențial antibacterian superior comparativ cu cele obținute din grăsimea fructelor de palmier și grăsimea de shea. S-a demonstrat că și în stare brută grăsimile din cocos și sâmburii de palmier au activitate antibacteriană, care se amplifică pe măsură ce se intensifică gradul de hidroliză enzimatică, care crește direct proporțional cu durata de cultivare a drojdiei.
4. S-a demonstrat că hidrolizatele enzimatică din grăsimile de palmier, cocos și shea au potențial antimicrobian inferior celui al antibioticelor de referință testate (streptomicină, vancomicină, penicilină și amoxicilină), însă având în vedere lipsa de toxicitate și metoda simplă de obținere propusă pot fi considerate potențiale substanțe naturale pentru asigurarea stabilității microbiologice și a siguranței alimentare.
5. Rezultatele obținute sunt valoroase întrucât demonstrează rolul de conservanți naturali al acizilor grași saturați, cu catenă medie, din compoziția grăsimilor și

hidrolizatorilor din grăsimi vegetale, având în vedere larga diversitate de grăsimi și uleiuri încă nestudiate.

8. Concluzii generale

- ✓ Potențialele beneficii ale plantelor atât în conservarea produselor alimentare cât și în îmbunătățirea caracteristicilor organoleptice ale anumitor alimente tradiționale, au fost exploatate din cele mai vechi timpuri.
- ✓ Interesul permanent pentru creșterea calității vieții și asigurarea siguranței alimentare a intensificat cercetările pentru înlocuirea aditivilor și ingredientelor de sinteză chimică cu produse naturale, în general de origine vegetală.
- ✓ Asigurarea stabilității microbiologice a alimentelor și a siguranței alimentare a intensificat cercetările pentru identificarea de noi compuși cu acțiune antimicrobiană. Sursele vegetale alături de microorganisme reprezintă sursele principale de producere a bioconservaților. În această categorie, acizii grași și în special acizii grași saturați cu catenă medie au demonstrat potențialul lor antimicrobian, competitiv cu cei mai eficienți bioconservați utilizați în industria alimentară.
- ✓ Uleiurile și grăsimile obținute din plantele tropicale au în compoziția chimică o concentrație ridicată de acizi grași saturați cu acțiune antimicrobiană. Pe aceste considerente, studiile realizate s-au orientat către trei grăsimi tropicale în stare brută, ulei de palmier, grăsime de cocos și grăsime de shea, țara de proveniență Cameroun, Africa.
- ✓ S-a studiat potențialul lipolitic pentru treisprezece tulpini de *Yarrowia lipolytica* izolate din diferite surse, prin cultivare în sistem staționar, pe medii îmbogățite în grăsime de palmier, cocos și shea, în diferite condiții fizico – chimice de cultivare.
- ✓ Hidroliza enzimatică grăsimii de palmier, cocos, shea condusă *in situ*, prin acțiunea lipazelor extracelulare sintetizate de tulpini selecționate de drojdie *Yarrowia lipolytica*, se desfășoară cu randamente sporite de hidroliză la temperatura 25°C, aw 0,98, după 7 zile de cultivare în sistem staționar (SSF).
- ✓ Tulpina de drojdie *Yarrowia lipolytica* RO13 se remarcă printr-un potențial superior, de a produce lipaze extracelulare, capabile să producă hidroliza în fază

solidă cu randamente sporite, ale celor trei grăsimi studiate, la temperatura ambientă și la temperatura de 4°C și diferite valori ale activității apei corelat cu prezența în mediu a NaCl în concentrații de 3-10%. S-a studiat compoziția în acizi grași eliberați din grăsimile tropicale și modificarea profilului compozițional prin transformarea acestora sub acțiunea drojdiei selecționate *Yarrowia lipolytica* R013, la temperatură 25°C, activitatea apei 0,98, după 3 zile și 7 zile de cultivare *in situ* pe mediu îmbogățit în grăsimi.

- ✓ S-a confirmat eficiența tratamentului enzimatic condus *in situ* asupra eliberării acizilor grași cu potențial antimicrobian, gradul cel mai eficient de eliberare a acizilor grași obținându-se după 7 zile de cultivare a drojdiei în condițiile menționate.
- ✓ S-a studiat potențialul antimicrobian împotriva unor bacterii potențial patogene al hidrolizatorilor din grăsimilor tropicale. Acizii grași liberi din compoziția extractelor exercită un efect antimicrobian sinergic.
- ✓ Prezența în concentrație mare a acizilor grași saturați cu catenă medie este corelată cu puterea bacteriostatică și bactericidă a hidrolizatorilor, care este inferioară față de puterea similară a unor antibiotice comerciale utilizate ca standarde de referință (spreptomycină, vancomycină, amoxicilină și penicilină).
- ✓ Activitatea antimicrobiană a extractelor de acizi grași din grăsimile de cocos, și sâmburii fructelor de palmier este superioară celei induse de extractele de acizi grași din grăsimea fructelor de palmier și de shea.
- ✓ Studiile realizate au valoare de cercetare fundamentală și aplicativă întrucât promovează concepte noi în conservarea alimentelor și asigurarea siguranței alimentare, prin aplicarea unei metode simple și eficiente din punct de vedere economic cu aplicații în industria alimentară sau în industria cosmetică.

9. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective

Originalitatea cercetărilor efectuate, în concordanță cu obiectivele științifice ale tezei de doctorat, este susținută de o serie de concepte științifice moderne promovate în abordarea cercetărilor, multe dintre acestea bazându-se pe studii realizate în premieră în țara noastră, după cum urmează:

- S-a demonstrat rolul grăsimilor tropicale de palmier, cocos și shea ca surse importante de acizi grași cu acțiune antibacteriană, față de bacterii Gram pozitive și Gram negative cu incidență în microbiologia alimentelor și factori de risc pentru siguranța alimentară.
- S-a demonstrat posibilitatea conducerii hidrolizei enzimaticice a grăsimilor *in situ*, prin cultivarea în fază solidă a drojdiei *Yarrowia lipolytica*, în condiții controlate de temperatură, activitate a apei și corelată cu prezența în mediu a sării. Aceste studii sunt o premieră pentru cercetările în domeniul abordat de teză și oferă numeroase perspective viitoare pentru noi inovații și potențiale dezvoltări și aplicații.
- S-a demonstrat specificitatea diferită pentru substrat și potențialul enzimatic variabil al tulpinilor de drojdie față de anumite grăsimi, corelat cu sursa de izolare și condițiile de cultivare, prin care se poate controla viteza de hidroliză, randamentul și spectrul în acizi grași eliberați.
- Se propune o metodă simplă și eficientă de bioconservare prin contactul direct al biocatalizatorului, celule de drojdie, cu substratul, lipide în stare solidă sau lichidă, în condiții similare cu cele din sistemele alimentare și în condițiile specifice pentru păstrarea alimentelor.
- Studiile sunt importante și pentru formularea de produse noi de us cosmetic.

În perspectiva cercetărilor viitoare se propune creșterea eficienței funcționalității drojdiilor *Yarrowia lipolytica* pe substraturi grase și realizarea hidrolizei enzimaticice prin comicroîncapsularea celulelor cu substratul și eliberarea controlată a acizilor grași cu acțiune microbiană, cu implicații în știința și ingineria alimentelor și în cosmetică.

DISEMINAREA REZULTATELOR CERCETĂRII

Diseminarea rezultatele cercetărilor s-a materializat prin publicarea sau comunicarea unor lucrări științifice după cum urmează:

A. Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **Georgiana Parfene**, Vicentiu Horincar, Amit Kumar Tyagi, Anushree Malik, Gabriela Bahrim (2013). Production of medium chain saturated fatty acids with enhanced antimicrobial activity from crude coconut fat by solid state cultivation of *Yarrowia lipolytica*, *Food Chemistry*, 136:1345–1349 (Factor de impact = 3,655)
2. **Georgiana Parfene**, Vicentiu Bogdan Horincar, Gabriela Bahrim, Lucia Vannini, Davide Gottardi, Maria Elisabetta Guerzoni (2011). Lipolytic Activity of Lipases from Different Strains of *Yarrowia lipolytica* in Hydrolysed Vegetable Fats at Low Temperature and Water Activity, *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6):46 – 52 (Factor de impact = 0,219)

B. Articole publicate în reviste indexate în baza de date internaționale

- 1 **G. Parfene**, V. B. Horincar, G. Bahrim (2012). Preliminary study regarding to use of some *Yarrowia lipolytica* strains for solid state hydrolysis of crude coconut fat. *Scientific Study & Research: Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 13(2): 187 – 192.
- 2 **Georgiana Parfene**, Vicențiu Bogdan Horincar, Gabriela Bahrim (2011). Hydrolysis of crude palm kernel oil with different microbial lipases. *Annals of "DUNAREA DE JOS" University of Galati, Mathematics, Physics, Theoretical Mechanics*, Fascicle II, Year III (XXXIV), 2:319 – 325.
- 3 **Georgiana Parfene**, Ștefan Dima, Vicențiu Horincar, Rodica Dinică, Gabriela Bahrim (2010). Approaches for the Development of New Food Biopreservatives Obtained by Self-Microemulsifying Formulation of Raw Coconut Fat and Lipase, *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 67 (2), 360 – 366.

C. Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale

- 1 **Georgiana Parfene**, Bianca Furdui, Mariana Lupoai, Gabriela Bahrim, Rodica Mihaela Dinică, Cellules vegetales utilisees comme biocatalyseurs dans les reactions organiques, *Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquee* (COFrRoCa), iulie 2012, Bacau, Romania.
- 2 **Georgiana Parfene**, Vicențiu Bogdan Horincar, Gabriela Bahrim, Evaluation of lipolytic activity of lipases from different strains of *Yarrowia lipolytica* strains for solid state hydrolysis of crude palm fat, *Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences*, May 24th – 27th, 2012, Braşov, Romania.
- 3 **Georgiana Parfene**, Vicentiu Bogdan Horincar, Lucia Vannini, Davide Gottardi, Maria Elisabetta Guerzoni. Lipolytic Activity of Lipases from Different Strains of *Yarrowia lipolytica* in Hydrolysed Vegetable Fats at Low Temperature and Water Activity, *4rd International Symposium on “New Research in Biotechnology”*, 10 -11th November 2011, Bucharest, Romania
- 4 **Georgiana Parfene**, Vicențiu Horincar, Gabriela Bahrim, Rodica Mihaela Dinică, Etude antimicrobienne des hydrolysats enzymatiques de deux matieres grasses: huile de palme et graisses de coco, *1^{er} Colloque Franco-Roumain de Chimie Medicinale*, COFr-RoCM, Iași, 7-8 Octobre 2010.
- 5 **Georgiana Parfene**, Ștefan Dima, Vicențiu Horincar, Rodica Dinică, Gabriela Bahrim. Approaches for the Development of New Food Biopreservatives Obtained by Self-Microemulsifying Formulation of Raw Coconut Fat and Lipase, *The 9th International Symposium “PROSPECTS FOR THE 3rd MILLENNIUM AGRICULTURE”*, 30 septembrie-2 octombrie 2010, Cluj – Napoca, România.

