

UNIVERSITATEA “ȘTEFAN CEL MARE” DIN SUCEAVA
FACULTATEA DE INGINERIE ALIMENTARĂ
Domeniul Ingineria Produselor Alimentare

TEZĂ DE DOCTORAT

Cercetări privind extracția de β -glucani din drojdia
de bere reziduală și valorificarea lor în filme
bioactive

REZUMAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
Prof. univ. dr. ing. Sonia AMARIEI

DOCTORAND:
Ing. Ionuț AVRĂMIA

Suceava
2022

MULȚUMIRI

Adresez mulțumiri doamnei **Prof. univ. dr. ing. Sonia AMARIEI**, coordonator al acestei teze de doctorat. Sunt profund recunoscător pentru șansa pe care mi-a acordat-o, sprijinul științific, îndrumarea atentă și disponibilitatea din perioada anilor stagiului doctoral. Perseverența, învățăturile constante și variate din fiecare etapă a studiilor universitare, de licență, masterat, iar acum, de doctorat, au reprezentat o investiție din partea Doamnei Profesor în reușita academică, dezvoltarea profesională și au însemnat un real sprijin pe plan moral.

Alese mulțumiri adresez doamnei **Conf. univ. dr. ing. Ana LEAHU** pentru încredere, orientare către activitatea de cercetare și sfaturile prețioase oferite încă din primii ani ai studiilor de licență.

Mulțumiri speciale aduc distinșilor membri din comisia de analiză și îndrumare pentru sfaturile și sugestiile acordate.

Mulțumirile mele se îndreaptă și către colegii din școala doctorală, cu care m-am putut consulta, am făcut schimb de idei și ne-am susținut reciproc. Deosebită considerație acord cadrelor didactice din departamentul Facultății de Inginerie Alimentară, care au dat dovadă de un înalt profesionalism.

Vă mulțumesc,
Ionuț AVRĂMIA

PREFAȚĂ

Cercetarea științifică își propune să contribuie cu soluții pentru două teme majore dezbătute la nivel mondial și anume promovarea unei economii circulare prin valorificarea drojdiei de bere reziduale cu obținerea de β -glucani și dezvoltarea de filme bioactive care să ofere o nouă perspectivă asupra tranziției de la medicamentele de sinteză la terapiile naturiste. Prezenta teză de doctorat este structurată pe 8 capitole și organizată în trei părți principale: un studiu aprofundat al literaturii de specialitate, cercetarea experimentală privind extracția β -glucanilor din drojdia de bere reziduală și dezvoltarea de filme bioactive pe bază de β -glucani.

În **partea întâi**, este prezentat stadiul actual al cercetărilor ce cuprinde importanța economică marcată de a valorifica drojdia de bere reziduală. Modul de acțiune și funcționalitatea β -glucanilor extrași a fost evidențiată prin capacitatea de stimulare a sistemului imunitar, efectul antiinflamator și prin abilitatea antimicrobiană. Dezvoltarea de filme bioactive cu adaos de diferite sucuri de fructe precum cel de rodie, afine ori merișoare va conduce la un efect complementar reglării sistemului imun. Astfel, prin principalii compuși ai sucului de rodie reprezentați de elagitannuri și acidul galic s-a demonstrat că se exercită un puternic efect antidiabetic, de îmbunătățire a funcțiilor vasculare, reducere a stresului oxidativ și rol protector cardiovascular indus de activarea sintezei eNOS în celulele endoteliale ale arterelor. Sucul de afine este recunoscut în principal datorită proprietăților sale puternic hipoglicemice. Farmacologia compușilor din afine este una extrem de complexă datorită numărului însemnat de până la 58 compuși fenolici, metabolismul celular de reglare al nivelului de glucoză se realizează în principal prin intermediul conținutului ridicat de antocianine din compoziția afinelor ce activează așa numitele enzime AMP-kinase. Compușii bioactivi majoritari din sucul de afine responsabili de activitatea de reducere a glucozei din sânge sunt reprezentați de acidul clorogenic, procianidine, malvidină-3-O-glucozid și cianidină-3-O-glucozid. Acești compuși conferă de asemenea protecție microvasculară și prezintă efect inhibitor asupra angiogenezei responsabile de apariția glaucomului și retinopatie. Sucul de merișoare prezintă proprietăți antimicrobiene, antioxidante și antiinflamatoare iar efectele bioactive sunt în special legate de conținutul de quercetină, catechine și flavonoli. Funcțiile vasculare sunt vizibil îmbunătățite după o lună iar metabolismul glucozei poate fi reglat după 12 săptămâni de consum.

În cea de-a **doua parte** se discută despre purificarea, extracția și caracterizarea β -glucanilor din drojdia de bere reziduală ca modalitate de a susține o economie circulară și ca alternativă la β -glucanii din drojdia activă.

Ultima parte cuprinde valorificarea β -glucanilor din drojdia de bere reziduală în filme bioactive pe bază de sucuri de fructe datorită proprietăților antidiabetice pe care acestea le dețin. Datorită proprietăților bune de barieră împotriva apei determinate, a flexibilității și solubilității ridicate aceste filme bioactive au prezentat potențial promițător de utilizare ca ambalaj al produselor de natură pulverulentă.

Structura tezei este realizată după cum urmează:

Capitolul I. Fundamente teoretice. β -glucanii din drojdia de bere reziduală și rolul lor.

Capitolul II. Materiale și metode privind extracția și caracterizarea β -glucanilor din drojdia de bere reziduală.

Capitolul III. Studiu experimental privind metodele de purificare, caracterizarea materiei prime și extracția β -glucanilor din drojdia de bere reziduală.

Capitolul IV. Cercetări privind dezvoltarea de filme bioactive ca adjuvant în bolile metabolice.

Capitolul V. Studiul filmelor bioactive cu destinație specială dezvoltate pe bază de β -glucan și suc de rodie.

Capitolul VI. Studiu privind dezvoltarea filmelor bioactive cu dizolvare rapidă pe bază de β -glucan și suc de afine.

Capitolul VII. Studiu privind dezvoltarea de filme pe bază de β -glucan și suc de merișoare.

Capitolul VIII. Concluzii generale și direcții de cercetare.

Cuvinte cheie: Drojdie de bere reziduală, β -glucan, stimularea imunității, filme bioactive, diabet zaharat, efect antidiabetic.

CUPRINSUL TEZEI

PREFAȚĂ

SCOP, OBIECTIVE ȘI JUSTIFICAREA ALEGERII TEMEI

Listă de termeni și abrevieri

CAPITOLUL I. FUNDAMENTE TEORETICE. β -GLUCANII DIN DROJDIA DE BERE REZIDUALĂ ȘI ROLUL LOR

Introducere

I.1. Producția de bere și drojdia de bere reziduală raportată la nivel mondial

I.2. Genul *Saccharomyces*

I.2.1. Celula drojdiei

I.2.2. Rezistența mecanică a drojdiei

I.2.3. Peretele celular al drojdiei și sinteza β -glucanilor

I.2.4. Replicările seriale și grosimea peretelui celular

I.3. Drojdia de bere reziduală

I.3.1. Caracterizare

I.3.2. Compușii amari și posibilitatea îndepărtării acestora

I.3.3. Conținutul glucanic al drojdiei de bere reziduale

I.3.4. Structura β -glucanilor

I.3.5. Solubilitate

I.3.6. Siguranța alimentară

I.4. Metode de extracție

I.4.1. Purificarea inițială

I.4.2. Liza celulară și ruperea peretelui celular

I.4.3. Extracția propriu-zisă

I.4.4. Purificarea finală a β -glucanilor extrași

I.4.5. Uscarea

I.5. Utilizări în industria alimentară

I.5.1. Utilizarea în iaurt

I.5.2. Utilizarea în maioneză

I.5.3. Utilizarea în pâine

I.5.4. Dezvoltarea de filme

Concluzii parțiale

Bibliografie selectivă

CAPITOLUL II. MATERIALE ȘI METODE PRIVIND EXTRAȚIA ȘI CARACTERIZAREA β -GLUCANILOR DIN DROJDIA DE BERE REZIDUALĂ

II.1. Materiale și aparatură

II.2. Metode experimentale de purificare și analiză a drojdiei de bere reziduale

II.2.1. Pretratamentul inițial al drojdiei

II.2.2. Conținutul de umiditate (U)

II.2.3. Determinarea conținutului proteic

II.2.4. Determinarea conținutului de lipide

II.2.5. Determinarea conținutului în cenușă

II.2.6. Determinarea compușilor amari din drojdia reziduală

II.2.7. Determinarea viabilității celulare

II.2.8. Determinarea profilului mineral prin spectrometrie de absorbție atomică (AAS)

II.2.9. Metodă de dizolvare a cristalelor de oxalat de calciu

II.3. Metode de liză celulară

II.3.1. Autoliza (AU)

II.3.2. Liza celulară prin intermediul bilelor de sticlă (BS)

II.3.3. Design-ul experimental

II.4. Metode de extracție și caracterizare a β -glucanilor

II.4.1. Extracția alcalină (A)

II.4.2. Extracția alcalin-acidă (AA)

II.4.3. Extracția combinată alcalin-acidă și autoclavare (AA-AC)

II.4.3. Purificarea și uscarea

II.5. Metode de analiză

II.5.1. Determinarea randamentului în β -glucani

II.5.2. Determinarea purității β -glucanilor

II.5.3. Analiza spectroscopică în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)

II.5.4. Examinarea microstructurii

Bibliografie selectivă

CAPITOLUL III. STUDIU EXPERIMENTAL PRIVIND METODELE DE PURIFICARE, CARACTERIZAREA MATERIEI PRIME ȘI EXTRAȚIA β -GLUCANILOR DIN DROJDIA DE BERE REZIDUALĂ

III.1. Studiu privind purificarea drojdiei de bere reziduale

III.1.1. Îndepărtarea conținutului grosier

III.1.2. Studiu privind îndepărtarea compușilor amari

III.1.3 Studiu microscopic al drojdiei de bere reziduale

III.1.4. Studiu privind îndepărtarea oxalatului de calciu

III.2. Caracterizarea materiei prime

III.2.1. Analiza microscopică de baleiaj (SEM) a drojdiei de bere

III.2.2. Compoziția chimică a drojdiei de bere

III.2.3. Aplicabilitatea determinărilor efectuate

III.3. Studiu experimental privind extracția și caracterizarea β -glucanilor

III.3.1. Liza drojdiilor sub acțiunea enzimelor proprii (autoliza – AU)

III.3.2. Liza peretelui celular cu ajutorul bilelor de sticlă (BS)

III.3.3. Extracția alcalină (A)

III.3.4. Extracția alcalin-acidă (AA)

III.3.5. Extracția combinată alcalin-acidă cu autoclavare (AA-AC)

III.3.6. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) a β -glucanilor

III.3.7. Microstructura β -glucanilor extrași

Concluzii parțiale

Bibliografie selectivă

CAPITOLUL IV. CERCETĂRI PRIVIND DEZVOLTAREA DE FILME BIOACTIVE CA ADJUVANT ÎN BOLILE METABOLICE

Introducere

IV.1. Studiu privind incidența diabetului și riscurile asociate acestei boli

IV.2. Studiu privind efectul β -glucanilor în bolile diabetice

IV.3. Materiale și metode utilizate în dezvoltarea filmelor

IV.3.1. Materiale utilizate

IV.3.2. Pregătirea soluției formatoare de film (FFS)

IV.3.3. Determinarea parametrilor fizico-chimici ale filmelor analizate

Bibliografie selectivă

CAPITOLUL V. STUDIUL FILMELOR BIOACTIVE CU DESTINAȚIE SPECIALĂ DEZVOLTATE PE BAZĂ DE β -GLUCAN ȘI SUC DE RODIE

V.1. Proprietățile bioactive ale sucului de rodie și proiectarea experimentală a filmului

V.1.1. Proiectarea optimă a amestecului pentru examinarea proprietăților filmelor

V.2. Rezultate experimentale

V.2.1. Determinarea grosimii și densității filmelor pe bază de β -glucan și suc de rodie

V.2.2. Studiul transportului vaporilor de apă prin filme (WVTR)

V.2.3. Permeabilitatea vaporilor de apă (WVP)

V.2.4. Conținutul de umiditate (U)

V.2.5. Solubilitatea filmelor

V.2.6. Opacitatea și culoarea filmelor

V.2.7. Activitatea apei (a_w)

V.2.8. Duritatea filmelor

V.2.9. Spectroscopia FT-IR

V.3. Proiectarea compoziției proxime a filmelor (optimizarea parametrilor procesului)

V.3.1. Validarea și confirmarea datelor prezise computațional

V.3.2. Evaluarea proprietăților optice în domeniul UV-VIS ale filmului optim

V.3.3. Calitatea microbiologică a probei optime

V.3.4. Microscopia cu scanare electronică (SEM)

V.4. Modelul ambalajului cu destinație specială realizat din filmele dezvoltate din β -glucani, suc de rodie și alginat de sodiu.

Concluzii parțiale

Bibliografie selectivă

CAPITOLUL VI. STUDIU PRIVIND DEZVOLTAREA FILMELOR BIOACTIVE CU DIZOLVARE RAPIDĂ PE BAZĂ DE β -GLUCAN ȘI SUC DE AFINE

VI.1. Proprietățile bioactive ale sucului de afine și proiectarea experimentală a filmului

VI.1.1. Proiectarea optimă a amestecului pentru examinarea proprietăților filmelor

VI.1.2. Analiza statistică a rezultatelor experimentale

VI.2. Rezultate experimentale

VI.2.1. Determinarea grosimii filmelor pe bază de β -glucan și suc de afine

VI.2.2. Studiu privind viteza de transmitere a vaporilor de apă prin film (WVTR)

VI.2.3. Permeabilitatea la vaporii de apă (WVP)

VI.2.4. Timpul de dizolvare al filmelor

VI.2.5. Activitatea apei (a_w) și conținutul de umiditate (U)

VI.2.6. Culoarea și opacitatea filmelor

VI.2.7. Evaluarea proprietăților optice în domeniul UV-VIS ale filmului optim

VI.2.8. Microscopia cu scanare electronică (SEM)

VI.2.9. Spectroscopia FT-IR

VI.2.10. Calitatea microbiologică a filmelor din β -glucan/suc de afine

Concluzii parțiale

Bibliografie selectivă

CAPITOLUL VII. STUDIU PRIVIND DEZVOLTAREA DE FILME PE BAZĂ DE β -GLUCAN ȘI SUC DE MERIȘOARE

VII.1. Proprietățile bioactive ale sucului de merișoare și proiectarea experimentală a filmului

VII.2. Rezultate și discuții

VII.2.1. Determinarea grosimii filmelor pe bază de β -glucan și suc de merișoare

VII.2.2. Studiu privind viteza de transmitere a vaporilor de apă prin film (WVTR)

VII.2.3. Determinarea permeabilității la vaporii de apă (WVP)

VII.2.4. Timpul de dizolvare al filmelor din β -glucan/suc de merișoare

VII.2.5. Proprietățile optice ale filmelor în domeniul UV-VIS

VII.3. Concluzii parțiale

Bibliografie selectivă

CAPITOLUL VIII. CONCLUZII GENERALE ȘI DIRECȚII DE CERCETARE

ANEXE

Decizie de autorizare a extinderii β -glucanilor din drojdie ca ingredient alimentar nou în conformitate cu regulamentul CE

Specificațiile tehnice ale drojdiei de bere pe care s-au efectuat studiile de cercetare

Metoda de testare ASTM E96/E96M – 16

LISTA DE LUCRĂRI

SCOP, OBIECTIVE ȘI JUSTIFICAREA ALEGERII TEMEI

Scopul prezentei teze de doctorat a fost unul dual ce a constat în valorificarea drojdiei de bere reziduale cu obținerea de compuși bioactivi precum β -glucanii iar prin cercetările aprofundate s-a oferit o direcție clară de utilizare a acestor carbohidrați insolubili prin dezvoltarea de filme bioactive cu potențial promițător de ambalare a produselor sub formă pulverulentă având ca destinație principală persoanele cu diabet.

Printre **obiectivele** urmărite în această cercetare s-a numărat realizarea unui studiu comprehensiv al literaturii de specialitate referitor la comportamentul morfofiziologic al drojdiei de bere reziduale pentru a se observa dacă schimbările din și după procesul fermentativ au un impact asupra β -glucanilor, s-a conceput metodologia de purificare și extracție prin proiectarea unor matrici experimentale care să includă parametrii adecvați drojdiei reziduale și s-a investigat efectul tratamentelor aplicate asupra parametrilor de calitate ai β -glucanilor obținuți.

Validarea rezultatelor cu obținerea de β -glucani biologic activi din drojdia de bere reziduală a permis conceperea și proiectarea de filme bioactive cu adaos din diverse sucuri (rodie, afine, merișoare) pentru proprietățile de stimulare a sistemului imunitar ale β -glucanilor și cele antidiabetice ale sucurilor de rodie, afine și merișoare. S-au ales cu grijă ingredientele din soluțiile formatoare de film precum agenții de gelifiere, plastifianții ori surfactanții, pentru o bună compatibilitate în realizarea filmelor. De asemenea, a fost studiată influența ingredientelor ce alcătuiesc filmul și s-au optimizat parametrii de lucru. Nu în ultimul rând, studiile experimentale au urmărit adaosul unui conținut cât mai ridicat în β -glucan și a diverselor sucuri care să permită o dizolvare rapidă în apă pentru o dispersie omogenă a compușilor bioactivi.

Justificarea alegerii temei s-a bazat în principal pe multiplele căi de acțiune (descrise pe larg în capitolele ce urmează) ce le induc β -glucanii din drojdie asupra sistemului imunitar. Motivarea alegerii drojdiei de bere reziduale a fost de a valorifica un subprodus din industria alimentară, iar prin procedeele de purificare și extracție s-a reușit obținerea acestor compuși bioactivi. Acești carbohidrați insolubili pot fi înglobați în diverse produse alimentare, însă, profitând de efectul bioactiv s-a procedat la dezvoltarea de filme bioactive prin utilizarea de diverse sucuri de fructe care să aducă un efect benefic în bolile metabolice precum este și cazul diabetului zaharat.

Trebuie de menționat că anul acesta, (a.c. 2022) se împlinesc 100 de ani de la descoperirea insulinei (brevet de invenție nr. 6255 în 1922 intitulat „*Pancreina și procedeul său de fabricare*”) de către cercetătorul român Nicolae Păulescu (1869-1931), iar înainte de descoperirea acesteia, persoanele cu diabet erau supuse unui regim alimentar sever din care nu lipseau anumite fructe cu rol antidiabetic care se utilizează și astăzi printre care enumerăm afinele și rodia. Studiile recente precum cele din 2021, arată de altfel o nouă perspectivă în tranziția de la medicamentele sintetice către compușii din plante.

Activitatea de cercetare a tezei de doctorat a fost realizată exclusiv cu ajutorul infrastructurii și a resurselor din dotarea laboratoarelor Facultății de Inginerie Alimentară, Universitatea “Ștefan cel Mare” din Suceava, 720229.

Listă de termeni și abrevieri

Fagocitoză – Proces de înglobare și de digerare a bacteriilor și a altor corpuri străine din organism de către fagocite;

Macrofage – Celule specializate implicate în detecția, înglobarea și îndepărtarea patogenilor din organism. Sunt una din cele 3 celule fagocitare cu rol în sistemul imunitar înăscut (celelalte două sunt monocitele și neutrofilele);

Subprodus – substanță sau obiect care rezultă în urma unui proces de producție al cărui obiectiv principal nu este producerea acestuia;

Alicot – sau parte alicotă este definită ca parte dintr-o catintate dată;

Liză celulară – rupere sau moarte celulară indusă de agenți chimici, fizici ori biologici. Caracteristic drojdiilor este procesul de autoliză indusă;

Baleiaj – Explorare cu ajutorul unui fascicul de electroni a unei suprafețe;

Organele – structuri specializate localizate în interiorul celulei precum: nucleu, aparat Golgi, mitocondrii, etc.;

Citokină – molecule de natură proteică ce transmit informații între celule diferite;

FT-IR – Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier;

ATR – unitate de reflectanță totală atenuată;

DBR – Drojdie de bere reziduală;

DBA – Drojdie de bere activă;

ANOVA – analiză de varianță;

G' – modul elastic;

G'' – modul vâscos;

LVR – regiune vâsco-elastică;

WVTR – Viteză de transmitere a vaporilor de apă prin film, în $\text{g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$;

WVP – Permeabilitatea la vaporii de apă, în $\text{g} \times \text{mm} \times \text{kPa}^{-1} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$;

FFS – Soluție formatoare de film;

SEM – microscop electronic de baleiaj sau microscop cu scanare electronică.

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

În **capitolul I** al prezentei teze intitulată “Cercetări privind extracția de β -glucani din drojdia de bere reziduală și valorificarea lor în filme bioactive” este expusă succesiunea cronologică ce a condus la investigarea polizaharidelor bioactive, este prezentată structura unică a β -glucanilor din drojdie și mecanismul de acțiune asupra sistemului imunitar.

Pentru o scurtă trecere în revistă asupra β -glucanilor din drojdie, Figura 1 prezintă evoluția metodelor de separare și implicit a întrebunțărilor pe care le primesc compușii glucanici de la descoperire până în prezent. În 1884, prin studiile sale asupra drojdiilor Metchnikoff a conturat bazele fagocitozei care mai târziu s-au dovedit a avea implicații asupra sistemului imunitar. Cu mai bine de 60 ani în urmă în anul 1956, β -glucanii au fost descriși pentru prima dată ca modificatori ai răspunsului biologic. Extrași la acea vreme cu un randament de 1-2% sub denumirea de “Zymosan”, au fost clasificați ca stimulatori ai sistemului imunitar, iar mai târziu s-au dovedit a avea proprietăți antitumorale prin legarea de receptorii complement (CR) ai sistemului imunitar adaptativ (Pillemer et al., 1956). Între 1968-69, după fracționarea polizaharidului (prin degradare Smith) și identificarea structurilor chimice β -1,3 și β -1,6, compușii izolați din pereții celulari ai drojdiei au primit denumirea de β -glucan (Bacon et al., 1969). Mai apoi au urmat studii clinice pe animale prin administrarea de β -glucani sub formă injectabilă (Patchen & MacVittie, 1985) iar în 1996 prin identificarea receptorilor Toll-like s-a reușit înțelegerea parțială a mecanismului de acțiune al β -glucanilor insolubili din drojdie în răspunsul imun prin activarea TLR2 și 4 (Brown, 2010; Kanjan et al., 2017). Odată cu dezvoltarea nanotehnologiei s-a readus în discuție dezvoltarea de vaccinuri pe bază de β -glucan, o descriere detaliată din 2019 oferă date promițătoare privind posibilitatea de a include aceste polizaharide ca vector de transport în vaccinuri (Vetvicka, 2020), iar studiile din 2021 își concentrează atenția asupra vaccinurilor intranazale (Mallakpour et al., 2021) care s-au obținut cu succes prin legarea de diferite fracții glucanice.

Se observă astfel o necesitate în întrebunțarea acestor compuși bioactivi, iar subprodusele¹ precum drojdia de bere reziduală sunt de un real interes în extracția β -glucanilor. Pe această cale se poate implementa conceptul de economie circulară, actualmente, investițiile în această zonă sunt extrem de consistente pentru valorificarea și gestionarea subproduselor rezultate din procesele industriale.

Drojdia reziduală este cel de-al doilea produs secundar din fabricarea berii. La nivel mondial numai în anul 2018 s-au produs circa 1.9 miliarde hL de bere. Din acest volum, Uniunea Europeană a produs peste 390 milioane hL de bere fiind considerată a fi cel de-al doilea mare producător de bere din lume, după China (Happy International Beer Day! - Product - Eurostat, n.d.; Marson et al., 2020). Aceasta are capacitatea de a genera ca subproduse aproximativ 0.9 milioane tone de drojdie de bere uzată (adică până la 4 kg/hL de bere) (San Martin et al., 2020), în timp ce alte studii indică valori până la 2.3 kg/m³ drojdie (I. M. P. L. V. O. Ferreira et al., 2010). Aceste subproduse de drojdie provenite din obținerea berii pot fi recuperate prin procesul de sedimentare (Lodolo et

¹ “Este considerat **subprodus**, și nu **deșeu** potrivit definiției de la pct. 9 din anexa nr. 1, o substanță sau un obiect care rezultă în urma unui proces de producție al cărui obiectiv principal nu este producerea acestuia și care îndeplinește, cumulativ, următoarele condiții:

- a) utilizarea ulterioară a substanței sau a obiectului este certă;
- b) substanța sau obiectul poate fi utilizat direct, fără a fi supus unei alte prelucrări suplimentare celei prevăzute de practica industrială obișnuită;
- c) substanța sau obiectul este produs ca parte integrantă a unui proces de producție;
- d) utilizarea ulterioară este legală, în sensul că substanța sau obiectul îndeplinește toate cerințele relevante referitoare la produs, la protecția mediului și protecția sănătății pentru utilizarea specifică și nu va produce efecte globale nocive asupra mediului sau a sănătății populației.” Sursa: <https://legeaz.net/legea-211-2011-regimul-deseurilor/art-5-subproduse>

al., 2008) cu valori între 1.7-2.3 g/L de bere (Pinto et al., 2015) sau până la 1.5-3 kg/100 L bere (Thiago et al., 2014).

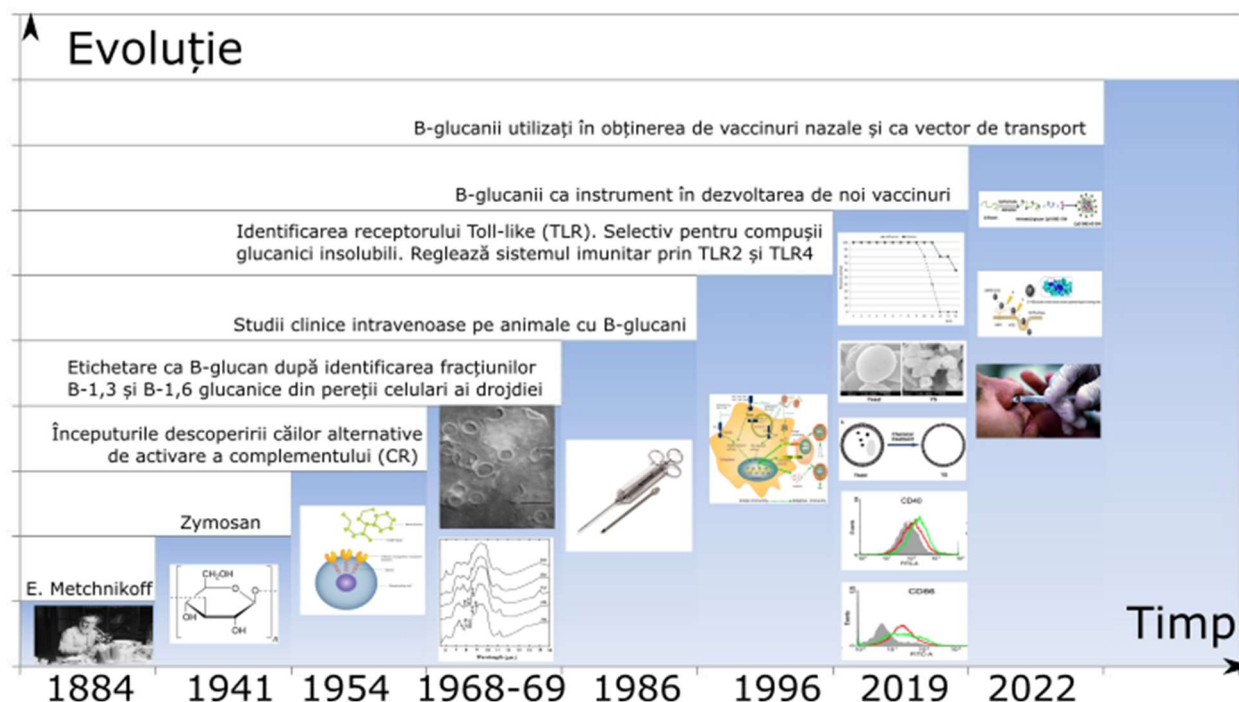


Figura 1. Evoluția metodelor de extracție a β -glucanilor și posibilitățile de valorificare, adaptat după Bacon et al., (1969); Brown, (2010); Kanjan et al., (2017); Mallakpour et al., (2021); Vetvicka, (2020).

Utilizate în principal în hrana animalelor, aplicarea diverselor procese de pretratare fac din drojdiile reziduale un produs cu multiple utilizări destinate consumului uman, astfel: pot spori sau conferi o aromă cărnosă produselor alimentare (Apostu et al., 2017; Tanguler & Erten, 2008); pot fi utilizate ca alternativă la producția de proteine (Ritala et al., 2017) sau ca extract de drojdie bogat în folați (Jacob et al., 2019). O abordare inovatoare o reprezintă purificarea și izolarea carbohidraților funcționali din pereții celulari, cu obținerea de β -glucani insolubili în apă, cu potențial crescut în industria farmaceutică și alimentară (Liepins et al., 2015; Worrasinchai et al., 2006).

Celula drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* este un model de studiu al celulelor eucariote și recunoscută în general ca fiind sigură. Celulele sunt sferice și elipsoidale cu dimensiuni între 1-7 μm lățime și până la 5-10 μm lungime. Este înconjurată de un perete gros ce delimitează la interior membrana celulară. În interiorul acesteia, prin matricea citoplasmatică împarte conținutul celular în: enzime, organite de depozitare, aparat Golgi, nucleu, reticul endoplasmatic, vacuole, lizozomi etc. Specia *cerevisiae* este protejată de un perete celular gros și rezistent mecanic compus majoritar din polizaharide și glicoproteine (Kollár et al., 1997; NORTHCOTE & HORNE, 1952) din care 50-55% este reprezentat de β -1,3 glucani și până la 15 % sunt β -1,6 glucani (Aimanianda et al., 2009; Kollár et al., 1997). Figura 2 ilustrează celula de drojdie în integralitate.

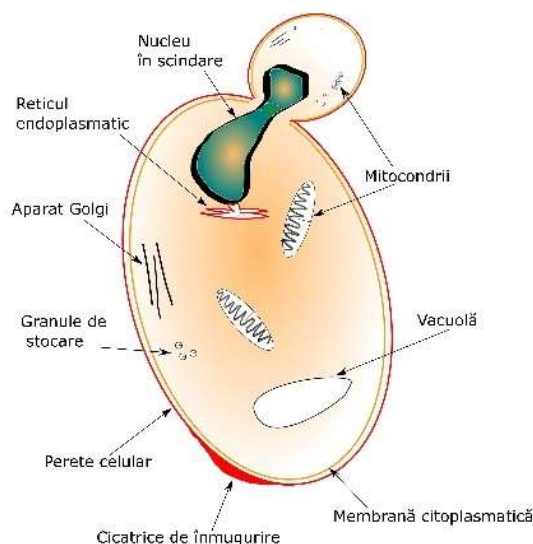


Figura 2. Celula de drojdie în momentul diviziunii.

O cantitate considerabilă de energie este alocată în formarea peretelui celular ce reprezintă până la 25% din greutatea celulei (procent variabil în funcție de condițiile de creștere) (Levin, 2005; D. Liu et al., 2016). Prin abilitatea de a răspunde la stres pentru a menține viabilitatea, drojdiile își cresc depozitul glucanic total cu până la 49% în timpul fermentării berii (Li et al., 2014). Conținutul în β -glucani al drojdiilor crește și odată cu procesul de maturare atunci când fermentarea la rece induce stres asupra celulei de drojdie (Lodolo et al., 2008). Acesta variază în principal, în funcție de natura mediului în care fermentează drojdia și de vârsta celulei (ce este stabilită prin numărul cicatricilor de înmugurire din fermentările seriale) (Powell & Diacetis, 2007). Sinteza este dirijată de așa numita cale de semnalizare a integrității peretelui celular (CWI) (Backhaus et al., 2010) și care în mare parte se concretizează în formarea de conținut glucanic (Klis et al., 2006). Este cunoscut că în procesul de fermentare al berii, drojdiile utilizează aproximativ 10% din zaharurile fermentescibile din mediu pentru biogenează (Onofre et al., 2017). Această energie este stocată într-un perete cu o grosime de 200 nm sub formă de carbohidrați.

β -glucanii sunt polizaharide alcătuite din monomeri ai D-glucosei uniți prin legături β -glicosidice (Bacic et al., 2009). Structura lor variază în funcție de tipul de configurație anomică a unităților β -d-Glcp, în distribuția spațială a legăturilor glicosidice, gradul de ramificare, gradul de polimerizare precum și prin greutatea moleculară. Astfel, se pot distinge β -glucani liniari, ramificați ori ciclici cu diverse legături glicosidice (Synytsya & Novák, 2013). β -1,3-glucanii înalt ramificați sunt astfel dovediți a prezenta un efect stimulator al imunității mult mai ridicat decât modelele liniare întâlnite la bacterii (S. S. Ferreira et al., 2015).

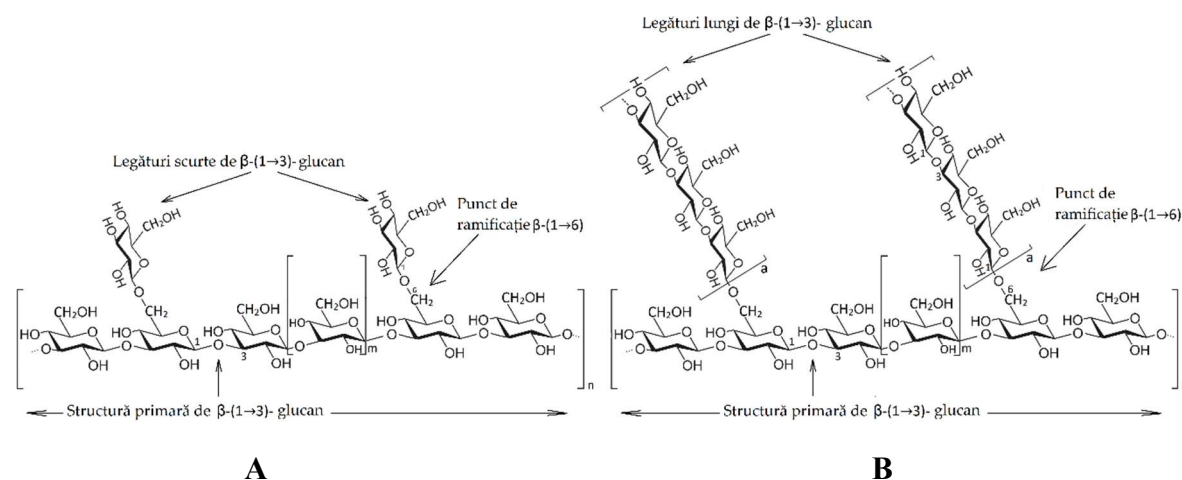


Figura 3. Reprezentarea schematică a β -glucanilor din drojdie: **A.** Forma solubilă a β -glucanilor; **B.** Forma insolubilă a β -glucanilor. În cele două ilustrații (A și B) se poate observa aceeași structură primară, rigidă, constituită din β -1,3-glucan însă la β -glucanii insolubili gradul de polimerizare crește din punctul de ramificație β -1,6 (Avramia & Amariei, 2021).

Din totalul glucanilor situați la nivelul peretelui celular o parte din ei sunt solubili iar 80-85% sunt insolubili în substanțe alcaline (Jaehrig et al., 2008), cei din urmă fiind subiectul cercetării din această teză. În contrast cu pereții celulari vegetali ce au ca polizaharid principal celuloza, alcătuită din lanțuri liniare de β -1,3 și interconectată prin β -1,4-glucan (Brennan & Cleary, 2005), în drojdie formele glucanice ale peretelui celular sunt alcătuite din monomeri ai glucozei având o structură de bază β -1,3 interconectată în lateral prin lanțuri β -1,6 (Kogan et al., 1988). Structura de bază se leagă covalent de alte componente ale peretelui celular astfel încât capetele nereducătoare sunt reticulate prin legături β -1,3, β -1,4 și β -1,6 de capetele reducătoare ale chitinei (Lesage & Bussey, 2006). Acestea sunt considerate a fi răspunzătoare de insolubilitatea în substanțele alcaline (Arroyo et al., 2016) iar prin legăturile intermitente se formează o rețea β -1,3/ β -1,6 tridimensională (Jaehrig et al., 2008), responsabilă de stimularea sistemului imunitar.

Sinteza β -glucanului are loc în mai multe regiuni celulare. Procesul de formare a glucanului are loc în membrana plasmatică și este catalizat enzimatic de glucan sintază (UDP-glucoză; 1,3- β -D-glucan 3- β -D-glucosiltransferază, EC 2.4.1.3) codată de gena FKS (1 și 2), care prin extrudare încorporează lanțurile nou formate în peretele celular (Aimanianda V, 2017). Ordinea în care acești compuși se găsesc în peretele celulei este: β -1,3-glucan $\rightarrow$ β -1,6-glucan $\rightarrow$ manoproteine (Aimanianda et al., 2017). Gradul de polimerizare al β -1,3-glucanului depinde în mare măsură de factorii externi și se realizează prin două căi sintazice legate de faza de creștere și de sursa de carbon (Klis et al., 2002). Cercetările biochimice asupra *S. cerevisiae* au indicat că sintaza legată de membrana celulară folosește UDP-glucoza ca substrat și constă dintr-o subunitate reglatoare citosolică și o subunitate catalitică cu afinitate pentru ATP și GTP (Kasahara et al., 1994; Tartar et al., 2005). O reprezentare schematică a peretelui celular este descrisă în Figura 4. Manoproteinele peretelui celular sunt direct conectate de β -1,3-glucan prin legături ce se rup relativ ușor în alcali și indirect de β -1,6-glucan printr-o ancoră glicozilfosfatidilinozitol (GPI) (Sanz et al., 2018). Acest strat cu o grosime de 30-40 nm situat către suprafața celulei (Wang et al., 2018) prezintă un

fragment proteic de aproximativ 100 kDa² ce poate fi parțial îndepărtat chimic, restul necesitând utilizarea de enzime (Ha et al., 2006).

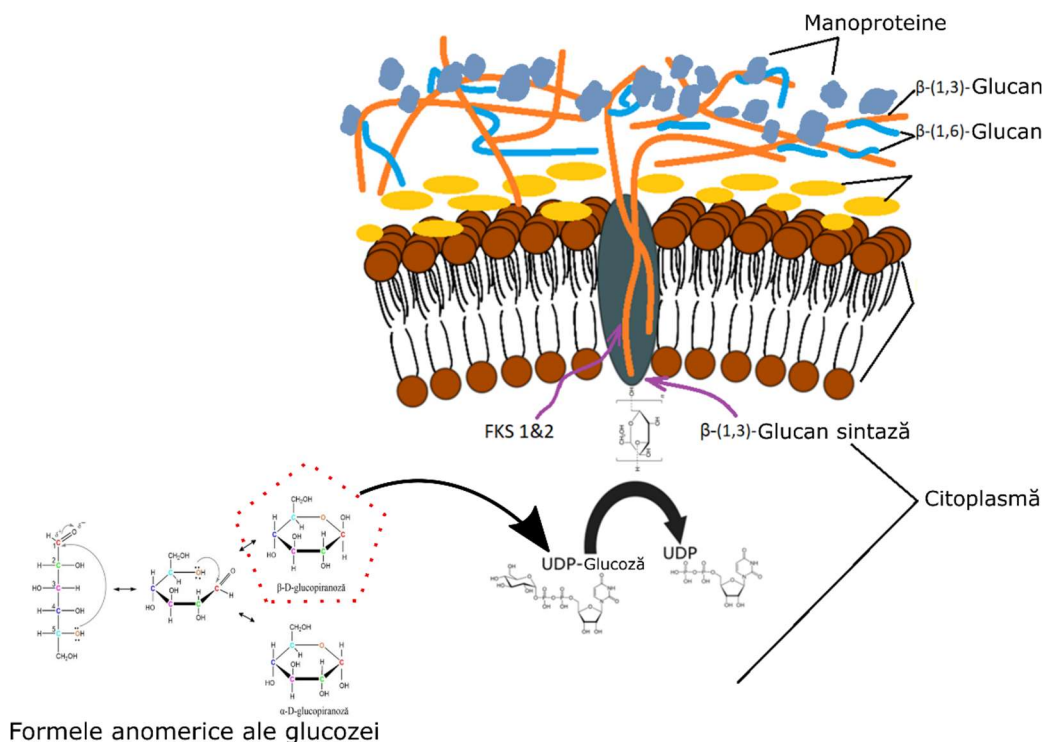


Figura 4. Reprezentarea schematică a peretelui celular, distribuția β-glucanilor în drojdia *Saccharomyces cerevisiae* și formele anomerice ale glucozei (α și β) necesare sintezei β-glucanilor.

Printre utilizările din industria alimentară pot fi menționate: folosirea în iaurturi pentru rolul prebiotic al polizaharidelor insolubile și de îmbunătățire a proprietăților fizico-chimice și texturale (da Silva Guedes et al., 2019; Raikos et al., 2018); utilizarea β-glucanilor în maioneză poate reduce conținutul de grăsime fără a influența caracteristicile fizico-chimice ale produsului finit (Worrasinchai et al., 2006); încă din stadiul de aluat, prin adaosul a 0.75% β-glucani din drojdia de bere reziduală s-a observat cea mai crescută valoare a rezistenței, aderenței și a lipiciozității. De asemenea, la această concentrație retrogradarea amidonului după 4 zile de refrigerare a prezentat cea mai scăzută valoare (Suwannarong et al., 2020); dezvoltarea de filme pe bază de β-glucani din drojdia *S. cerevisiae* având ca plastifiant glicerina a prezentat proprietăți structurale și fizice îmbunătățite, modulul de elasticitate, rezistență și tensiune la rupere al acestor filme fiind de 712 MPa, 17.48 MPa și 14.16 MPa (Novák et al., 2012). Totodată, M. Peltzer et al., (2018) printr-o analiză a diferitelor tipuri de β-glucani au concluzionat că forma β-1,3/1,6 regăsită în drojdie are cea mai mare aplicabilitate pentru dezvoltarea filmelor pentru contactul cu produsele alimentare precum și pentru domeniul medical.

Capitolul II al tezei prezintă materialele și metodele privind extracția și caracterizarea β-glucanilor din drojdia de bere reziduală. Sursa de drojdie de bere reziduală (DBR) utilizată în procesele de extracție a β-glucanilor a fost achiziționată de la fabrica de bere SC. Bermas SA., Suceava, România. Drojdia de bere utilizată în procesele fermentative de obținere a berii este

² 1 Da (Dalton) = Unitate de măsură pentru masă, definită ca a 1/12 - a parte din masa izotopului de ¹²C și este egală cu 1.66053×10⁻²⁴ g.

produsă de firma Fermentis (Lesaffre, Franța) sub denumirea de SafLager™ W-34/70. Această drojdie aparține genului *Saccharomyces*, specia *cerevisiae*. Drojdia colectată a fost prelucrată cât de curând posibil, respectându-se lanțul frigorific pentru a preveni eventualele procese de degradare celulară. De asemenea, pentru un studiu comparativ, fabrica de bere ne-a furnizat cu amabilitate și o probă de drojdie de bere uscată activă din lotul de fabricație (denumită în continuare DBA).

Principalele metode privesc analiza materiei prime inițiale, studiu privind purificarea și îndepărtarea compușilor amari și sunt urmate de procedeele de liză celulară, extracție și caracterizare a β -glucanilor.

În **capitolul III** sunt prezentate rezultatele cercetărilor privind analiza drojdiei de bere reziduale, purificarea, extracția și caracterizarea β -glucanilor. Figura 5 prezintă în contrast imaginile SEM ale drojdiei de bere reziduale și a celei active. Drojdia de bere activă (Figura 5A) înainte de procesul fermentativ relevă structuri elipsoidale cu dimensiuni între 4-7 μm și până la 2-3 cicatrici de înmugurire. În schimb, celulele drojdiei de bere reziduale (Figura 5B) sunt vizibil crescute în dimensiune, cu pereții celulari neregulați, consecință a procesului de autoliză indusă din timpul și după procesul fermentativ. Conținutul citoplasmatic este eliberat parțial prin microfisurile create la nivel celular în lichiorul de bere.

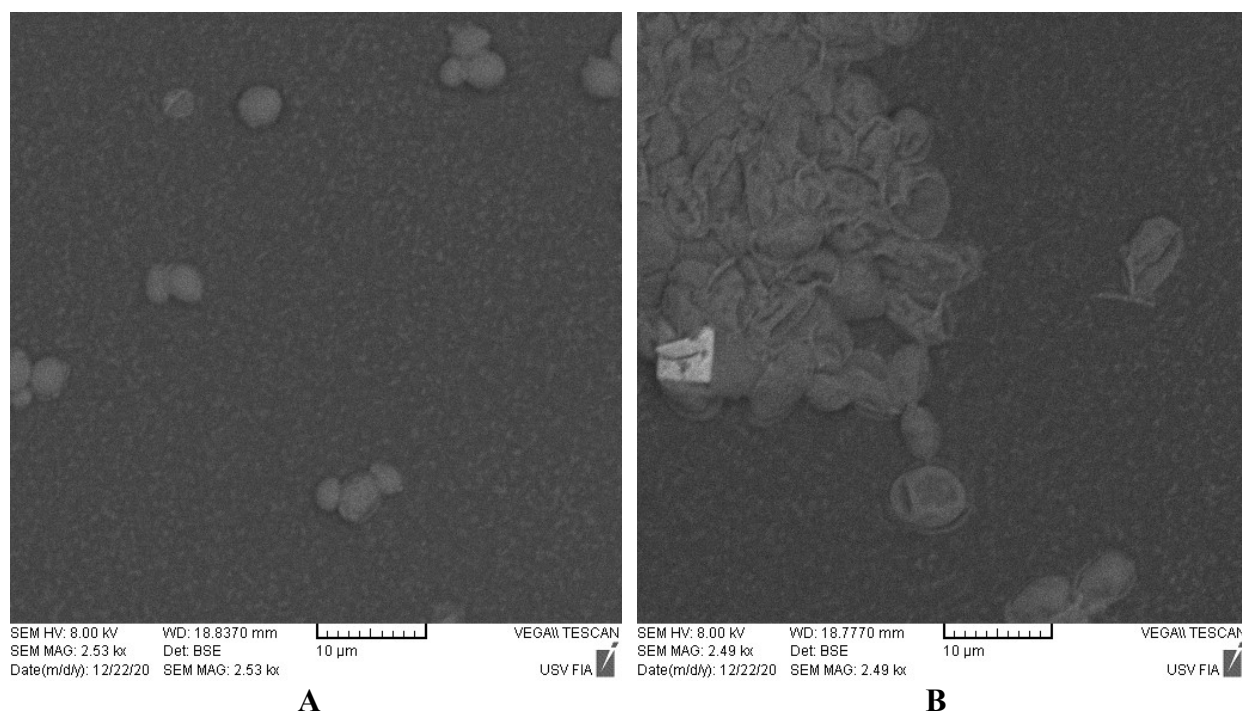


Figura 5 Microscopia electronică de baleiaj (SEM) a drojdiei de bere. **A.** Drojdie de bere activă; **B.** Drojdie de bere reziduală (factor de mărire 2.5 kx, detector de electroni retroîmprăștiati).

Aceste modificări conform lui Francois et al., (2013) pot atinge valori de până la 10-25% din masa totală a celulei iar după Tian et al., (2019) pereții drojdiei de bere reziduale pot atinge valori și de 225 nm (cu 25 nm mai groase decât media descrisă în literatura de specialitate). Creșterea în grosime a peretelui celular este legată în special de conținutul ridicat de β -glucan format, care conform lui Aguilar-Uscanga & François, (2003) poate atinge valori de până la 21%

(în special a fracțiunii scurte β -1,6 legate de glucanul β -1,3 în celulele cultivate pe etanol). În urma analizei compoziției chimice, datele noastre au evidențiat o creștere a conținutului în β -glucan de la 15.60% (g/g) la drojdia de bere activă la 17.02% (g/g) la drojdia de bere reziduală.

Purificarea s-a realizat prin îndepărtarea conținutului grosier, a lichiorului de bere și a particulelor în suspensie prin sitare (dimensiune a porilor $<100\ \mu\text{m}$ și centrifugare). Studiul privind îndepărtarea compușilor amari reprezentați în special de humuloni și izohumuloni, în urma optimizării, a scos în evidență că pentru slăbirea forțelor de adsorbție a compușilor amari este necesar un tratament alcalin cu NaOH 2N și ajustarea pH-ului la 10 sub continuă agitare. Timpul de contact optim cu suspensia celulară (Figura 6) a fost de 10 minute la 50 °C.

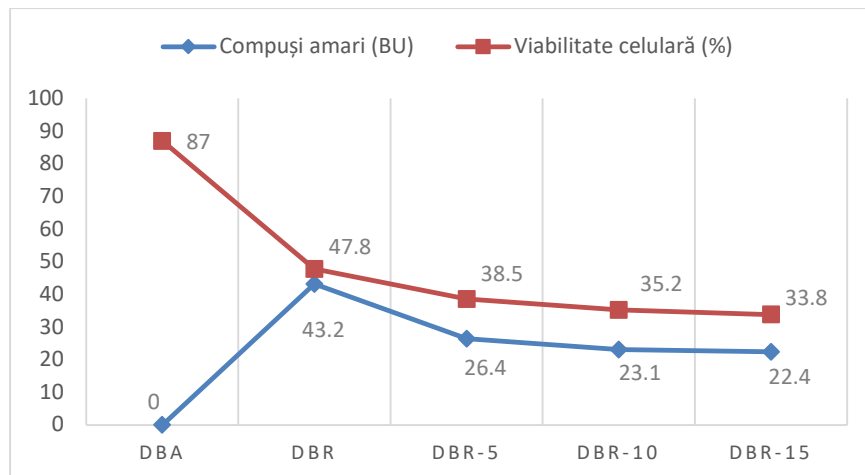


Figura 6 Modificări ale compușilor amari și viabilitatea celulară din timpul procesului de purificare.

Proba de control a drojdiei de bere reziduale DBR înainte de contact cu NaOH a avut un conținut în substanțe amare de 43.2 BU, ceea ce este caracteristic drojdiei de bere reziduale. O reducere vizibilă este prezentă după 10 minute în proba DBR-10 (23.1 BU), iar la 15 minute după contact în proba DBR-15 nu se mai observă nicio scădere apreciazabilă a compușilor amari (22.4 BU). Aceste rezultate indică faptul că un timp mai lung de 10 minute nu crește eficiența procesului de dezamărire ci doar viabilitatea celulelor se va diminua.

Liza drojdiei de bere reziduale s-a realizat prin două metode sub acțiunea enzimelor proprii (autoliză) și prin intermediul bilelor de sticlă. Pierderea în biomasă exprimată prin viteza de autoliză de-a lungul celor 24 de ore de contact observate în Figura 7 prezintă valori cuprinse între 46.81% și 51.15% în funcție de temperatura la care au fost menținute probele.

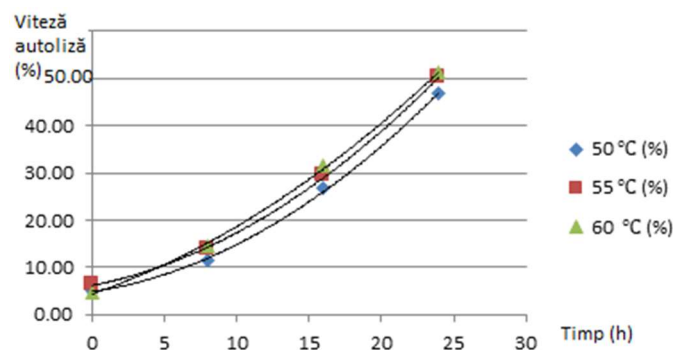


Figura 7. Influența temperaturii asupra biomasei pierdute.

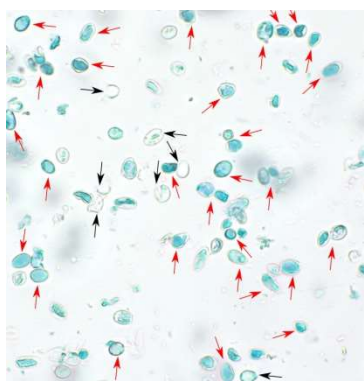
În toate cele 3 experimente, la finalul celor 24 h viabilitatea celulelor realizată prin metoda colorimetrică a fost zero astfel că s-a putut trece în următoarea etapă, cea de extracție a β -glucanilor. O viteză a autolizei ridicată înseamnă un conținut intracelular mai mic în celula drojdiei astfel va exista și o viteză de extracție mai mare a β -glucanilor din pereții celulari. Pentru a conduce procesul de autoliză, parametrii indicați sunt: conținut în substanță uscată a suspensiei de drojdie de 15%, timp de autoliză de 24 h, temperatură de 55 °C și o pasteurizare de 15 min/80 °C la finalul procesului pentru inactivarea enzimelor proprii.

Liza peretelui celular cu ajutorul bilelor de sticlă a fost realizată prin utilizarea metodologiei suprafețelor de răspuns (RSM). Efectul concentrației suspensiei celulare (de 5, 10 și 15%), raportul dintre drojdie și bilele de sticlă (1:1, 1:2, 1:3) precum și numărul de cicluri de vortexare (1x, 2x, 3x) a fost variat la trei niveluri asupra răspunsului de eficiență a ruperii celulare, care a fost investigat cu ajutorul unui model experimental Box-Behnken. Efectul parametrilor privind eficiența ruperii celulare (Tabelul 1) a condus la valori între 14.54% și 99.87% în funcție de condițiile aplicate și a prezentat diferențe semnificative ($p < 0.05$) între probe.

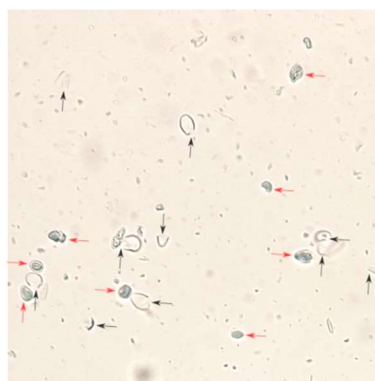
Tabelul 1. Efectul parametrilor independenți asupra ruperii celulare și conținutul în β -glucan al probei optime.

Concentrație suspensie celulară, (%)	Raport drojdie/ bile de sticlă, (v/w)	Cicluri de vortexare, (x10 min)	Eficiența ruperii celulare (%)
5	1:1	2	34.85 ^h
5	1:2	1	45.62 ^e
5	1:2	3	99.87 ^a
5	1:3	2	78.93 ^c
10	1:1	1	21.55 ^j
10	1:1	3	44.05 ^f
10	1:2	2	41.66 ^g
10	1:3	1	33.45 ⁱ
10	1:3	3	93.97 ^b
15	1:1	2	14.54 ^l
15	1:2	1	15.12 ^k
15	1:2	3	49.09 ^d
15	1:3	2	21.59 ^j

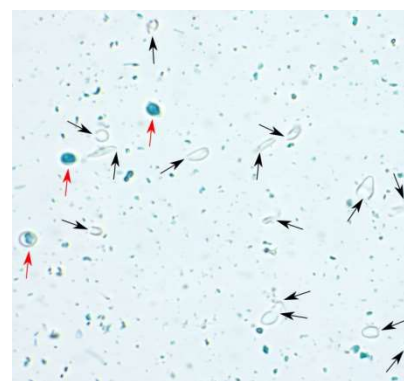
a-l – litere diferite din aceeași coloană arată diferențe semnificative între eșantioane ($p < 0.05$)



A. 15% suspensie celulară; 1:2 raport drojdie/ bile de sticlă; 1x cicluri de vortexare (15.1%)



B. 10% suspensie celulară; 1:2 raport drojdie/ bile de sticlă; 2x cicluri de vortexare (41.6%)



C. 5% suspensie celulară; 1:2 raport drojdie/ bile de sticlă; 3x cicluri de vortexare (99.8%)

Figura 8. Gradul de rupere celulară. Trei probe reprezentative cu raport drojdie/ bile de sticlă de 1:2 la diferite cicluri de vortexare (1x, 2x, 3x) și concentrații de drojdie diferite (5%, 10%, 15%). Nu sunt prezente celule vii (mărire 400x).

Rezultatele obținute în urma procesului de optimizare au arătat că o concentrație a suspensiei de drojdie de 5%, un raport de drojdie /bile de sticlă de 1:2 și 3 cicluri de vortexare a câte 10 minute fiecare ar fi parametri optimi pentru liza celulelor de drojdie reziduale ce oferă o eficiență de rupere de 99.87%. Săgețile cu negru evidențiază celulele fragmentate, cu pereți celulari neregulați, ca rezultat al coliziunii drojdiei în regiunea efectivă de rupere celulară dintre bilele de sticlă în timp ce săgețile cu roșu prezintă celulele moarte colorate cu albastru de metilen. Colorația albastră indică că celulele încă păstrează conținutul intracelular deoarece nu au fost deteriorate de bilele de sticlă și nu sunt dizolvate în faza continuă (Solecki et al., 2021).

Extracția β -glucanilor s-a realizat după liza celulară și a fost realizată prin trei metode: alcalină, alcalin-acidă și combinată. Pentru extracția alcalină s-au utilizat trei concentrații diferite de NaOH (1, 1.5 și 2 N). Pentru toate testele, extracția de β -glucan a fost efectuată mai întâi din celulele de drojdie autolizate și apoi s-a procedat la extracția din celulele fragmentate cu ajutorul bilelor de sticlă. Rezultatele cercetărilor experimentale sunt prezentate în Tabelul 2 care prezintă variația compușilor din β -glucan în funcție de creșterea concentrației de NaOH.

Tabelul 2. Date privind randamentul și conținutul în β -glucani al extractelor obținute din drojdia de bere reziduală *S. cerevisiae* prin metoda alcalină.

Procedura de liză celulară	Concentrația de NaOH	Randamentul în β -glucan, %	% Puritatea extractului (g/g)
Autoliză (AU-A-1N)	1 N	11.96	55.39
Autoliză (AU-A-1.5N)	1.5 N	10.68	56.45
Autoliză (AU-A-2N)	2 N	9.01	59.81
Bile de sticlă (BS-A-2N)	2 N	5.28	63.81

AU-A-1N – (AU= autoliză, A=tratament alcalin, 1N=concentrație NaOH 1N); BS-A-2N – (BS=bile sticlă).

Astfel, randamentul în β -glucan din celulele de drojdie autolizate a variat între 11.96% și 9.01%, în timp ce puritatea extractului prezintă o ușoară creștere de la 55.39% la 59.81% prin utilizarea soluțiilor concentrate de hidroxid de sodiu. Cea mai mare puritate de 59.81% β -glucan a

fost găsită în proba cu cel mai mic randament de extracție (9.01% în proba AU-A-2N). Menținând condițiile de extracție care au determinat cel mai înalt grad de puritate (de 59.81% la 2 N NaOH) asupra pereților celulari dezintegrați prin bile de sticlă, s-a constatat că randamentul de β -glucani a scăzut semnificativ la 5.28%, iar puritatea extractului nu a depășit valoarea de 63.81% (proba BS-A-2N).

Rezultatele extracției alcalin-acide, a efectului concentrației în NaOH precum și a diverselor soluții de acid utilizate în extracția β -glucanilor sunt prezentate în Tabelul 3. Din datele obținute poate fi observat că randamentul extracției β -glucanilor variază între 3.66 și 8.95%. Cel mai ridicat randament (8.95%) este întâlnit la proba autolizată, tratată cu NaOH 1 N/ 90 °C/ 2 h, urmată de un tratament cu acid acetic 1 N/ 75 °C/ 2 h. Puritatea determinată prin metoda enzimatică (prin utilizarea de β -glucanaze, β -glucozidaze și chitinaze) a acestui extract este de 69.1%.

Tabelul 3. Efectul concentrației NaOH și al soluțiilor de acizi asupra extracției β -glucanilor.

Proces liză celulară	Concentrație soluție alcalină	CH ₃ COOH		HCl		H ₃ PO ₄	
		Randament extracție (%)	% β - glucan (g/g)	Randament extracție (%)	% β - glucan (g/g)	Randament extracție (%)	% β - glucan (g/g)
Autoliză	NaOH 1 N	8.95	69.10	8.17	73.99	4.43	53.13
	NaOH 1.5 N	8.77	74.07	7.79	79.55	4.09	53.89
	NaOH 2 N	7.89	75.2	7.03	78.12	3.66	54.11
Bile sticlă	NaOH 1 N	4.88	78.53	5.36	73.8	n.d.	n.d.

Puritatea β -glucanilor extrași prin metoda alcalin-acidă variază și ea în limite destul de largi de la 53.13% la 79.55%. Frația cea mai purificată a rezultat prin utilizarea procedurii de autoliză a celulelor de drojdie reziduală, extracție alcalină cu NaOH 1.5 N/ 90 °C/ 2 h și extracție acidă cu HCl 1 N/ 75 °C/ 2 h. Randamentul de extracție al acestei probe a fost de numai 7.79%. Cele mai mici valori ale β -glucanilor de 54.11% și randament de 3.66% au fost găsite la probele tratate cu acid fosforic. Acest lucru s-a datorat cel mai probabil concentrației prea mari de acid (1 N) ce a degradat lanțul polizaharidic.

Extracția combinată alcalin-acidă cu autoclavare a fost evaluată prin sedimentul obținut cu cea mai ridicată fracție în β -glucan prin metoda alcalin-acidă (de 79.55%). Astfel, prin parcurgerea procesului de extracție au rezultat trei valori diferite, în funcție de temperatura de autoclavare la care au fost supuse extracțele (110, 120 și 130 °C). Conform datelor obținute, randamentul de extracție al probelor după autoclavarea sedimentului glucanic extras prin metoda cu NaOH/HCl, 1.5 N/ 1 N a fost cuprins între 6.05% la 130 °C și 7.35% la 110°C.

Prin analiza spectroscopică în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) a β -glucanilor s-a verificat calitatea compușilor extrași. Astfel, fiecare vârf regăsit în regiunea spectrală de amprentă la probele de β -glucan a fost descris în Tabelul 4. S-au observat în toate probele peak-uri între 1103.81 cm⁻¹ și 1105.17 cm⁻¹ care sunt în apropierea zonei 1105 cm⁻¹ caracteristică β -1,3-glucanului în timp ce vârfurile între 1151.35 cm⁻¹ și 1152.85 cm⁻¹ sunt deplasate cu 5 cm⁻¹ comparativ cu 1147 cm⁻¹. Un alt vârf caracteristic pentru legătura β -1,3-glucan a fost regăsit în apropiere de 1370 cm⁻¹ care corespunde vibrației cu unghi variabil a grupării C–H (I. C. Ferreira et al., 2020; H. Liu et al., 2020).

Tabelul 4. Frecvențele benzilor FT-IR pentru compușii β -glucanici extrași.

Cod probă/ Număr de undă (cm^{-1})							Atribuire	Referință
AU-A-2N	B-A-2N	AU-AA-2N-CH ₃ COOH	AU-AA-1.5N-HCl	AU-AA-2N-H ₃ PO ₄	B-AA-1N-CH ₃ COOH	AU-AA-1.5N-HCl-120		
847.83	842.98						Legătură α -glicozidi că	(Zechner-Krpan et al., 2010)
891.73	888.68	892.06	889.06	889.07	888.55	889.13	Configurație β	(Abdel Naser A. Zohri, 2019)
	992.91	995.82	993.45	995.00	993.41	995.35	β -1,6-glucan	(Pengkumsri et al., 2017)
1019.76	1015.04	1015.91					α -1,4-glucan	(Pinto et al., 2015)
1074.90	1071.70	1074.24	1072.32	1072.88	1071.13	1070.03	β -1,6-glucan	(Galichet et al., 2001)
1104.26	1104.15	1104.14	1105.16	1103.81	1105.17	1104.76	β -1,3-glucan	(Galichet et al., 2001)
1152.85	1152.02	1151.71	1151.35	1151.99	1152.51	1152.78	β -1,3-glucan	(Galichet et al., 2001)
1374.37	1363.13	1373.91	1373.70	1373.79	1363.20	1373.51	β -1,3-glucan	(I. C. Ferreira et al., 2020)

O bandă distinctă pentru β -glucani este regiunea dintre 992.91cm^{-1} și 995.82 cm^{-1} care conform lui Pengkumsri et al., (2017) aparține β -1,6-glucanului ($\sim 998\text{ cm}^{-1}$). Pot fi de asemenea observate peak-uri dominante în apropierea numărului de undă 1073 cm^{-1} care este asociat întinderii vibraționale O–H a carbonului C₆ din legătura β -1,6 (Chang et al., 2019a; Galichet et al., 2001). La probele extrase numai prin metoda alcalină (AU-A-2N și B-A-2N) cu NaOH 2 N observăm două vârfuri de absorbție la 847.83 și 842.98 cm^{-1} respectiv, care conform lui Zechner-Krpan, Petravić-Tominac, Gospodarić, et al., (2010) ar indica prezența α -glucanilor. Acest lucru a fost confirmat și era de așteptat pentru extracția într-o singură etapă prin conținutul redus al purității extractului ($\sim 59\%$). În plus, peak-urile din jurul 1015 cm^{-1} sunt corelate cu prezența α -1,4-glucanului (Pinto et al., 2015).

Capitolul IV intitulat *Cercetări privind dezvoltarea de filme bioactive ca adjuvant în bolile metabolice* oferă o direcție clară de utilizare a β -glucanilor extrași din drojdia de bere reziduală. Dezvoltarea de filme s-a realizat prin utilizarea β -glucanilor pentru efectul de stimulare al sistemului imun și de protecție asupra celulelor β -pancreatice în timp ce diversele sucuri au fost utilizate pentru efectul antidiabetic, pentru rolul vasoprotectiv, antioxidant, de reducere a stresului oxidativ și de îmbunătățire a funcțiilor vasculare.

S-a demonstrat că administrarea orală de β -glucan la șoareci promovează homeostazia glucozei și lipidelor din ficat, descoperiri cu potențial ridicat în diabet și obezitate (Cao et al., 2017). Studii conduse în 2014 au concluzionat că, prin stimularea sistemului imun prin intermediul căii de semnalizare dectină-1, β -glucanii pot fi utilizați să moduleze acțiunea celulelor T responsabile

de distrugerea celulelor β -pancreatice producătoare de insulină și astfel se poate asigura o protecție pe termen lung a celulelor secretoare de insulină în diabetul de tip I (Karumuthil-Melethil et al., 2014). Un studiu recent asupra rezistenței la insulină a evidențiat că suplimentarea cu 0.1% β -glucani din drojdie în dieta animalelor a redus nivelul insulinei bazale, nivelul de trigliceridele și concentrația de colesterol (C. S. Ferreira et al., 2022).

Diabetul zaharat sau “diabet mellitus” face parte dintr-un grup de boli metabolice având ca particularitate hiperglicemia determinată de secreția defectuoasă a insulinei, acțiunea insulinei sau ambele. Preponderent, sunt cunoscute 4 tipuri de diabet: diabetul de tip I sau insulino-dependent în care organismul nu mai produce insulină, diabetul de tip II determinat de incapacitatea pancreasului de a produce suficientă insulină necesară organismului sau de rezistența celulelor la acțiunea acesteia, diabetul gestațional care este întâlnit la femeile gravide și dispare după sarcină (McIntyre et al., 2019) și diabetul de tip III, introdus pentru prima dată în anul 2005 care îmbracă particularități atât din diabetul de tip I cât și din II și care este asociat cu boala Alzheimer (Kroner, 2009). La cele patru tipuri se mai adaugă și diabetul genetic moștenit (monogenic) care este o afecțiune genetică rară manifestată prin mutația unei gene ce însumează de la 1 până la 5% din totalul cazurilor diabetice (Zhang et al., 2021). Gena cauzează în principal o dezvoltare defectuoasă a celulelor β -pancreatice secretoare de insulină și provoacă diabet indiferent de alți factori. Mai mult, în literatura de specialitate există și diabetul indus medicamentos sau de diferite substanțe chimice. Unele substanțe chimice care ne înconjoară sau medicamente, pot desigur să altereze secreția de insulină, iar studiile clinice utilizează adesea streptozotocina (un agent chimioterapic) în a induce diabetul la șoareci pentru a descoperi noi tratamente împotriva diabetului (Mbara et al., 2022). Dintre acestea primele două tipuri sunt cele mai des întâlnite și constituie o problemă de sănătate în expansiune la nivel global.

Un studiu realizat în 2019 estimează că această afecțiune gravă, pe termen lung și cu un impact major asupra vieții și bunăstării indivizilor din întreaga lume afectează în jurul a 463 de milioane de persoane (adică 9.3% din populația globului) (Saeedi et al., 2019). S-a estimat că până în 2030 acest număr va crește la 578 milioane de persoane, iar în 2045 acesta va fi de 700 milioane de oameni (echivalentul a 10.9% din populație), cu peste 200 de milioane mai mult decât numărul din 2019.

Evoluția lentă (adică cronicizarea) a hiperglicemiei în diabet se asociază cu leziuni pe termen lung, tulburări funcționale ale organelor precum și deteriorarea acestora în special la nivelul ochilor, rinichilor, nervilor, inimii și a vaselor de sânge (Mellitus, 2005). Complicațiile pe care le poate provoca diabetul zaharat la nivel vascular cuprind: retinopatie, albuminurie, scleroză renală, obstrucția vaselor de sânge la nivelul picioarelor, la nivel coronarian și al sistemului cerebral (Lawrence, 1951).

Un control glicemic neadecvat în diabet poate conduce de asemenea către neuropatie, o complicație comună în diabet care se manifestă prin pierderea funcției senzoriale, începe de la extremitățile inferioare și se caracterizează prin durere datorată afectării sistemului nervos (Feldman et al., 2019). În 2021 Arora et al., (2021) printr-un studiu comprehensiv asupra medicației în diabet a arătat o nouă perspectivă în tranziția de la medicamentele sintetice către compuși din plante. Aceasta împreună cu colaboratorii au scos în evidență componentele bioactive din plante și potențialul ridicat pe care îl pot juca plantele medicinale în tratamentul afecțiunilor precum este și cazul neuropatiei diabetice (Arora et al., 2021). Dintre fructele cunoscute în literatura de specialitate pentru scăderea nivelului glicemic și pentru exercitarea unui efect vasoprotector amintim afinele și rodia în timp ce merișoarele contribuie la controlul nivelului glicemic.

Astfel, în vederea dimensionării filmelor s-a avut în vedere ca: să nu se depășească cantitatea de compuși maxim admisă ori recomandată de către autoritățile sau organismele abilitate

în domeniu; fiecare dintre ingredientele folosite în obținerea filmelor să aducă un aport susținut în diabet pentru a justifica necesitatea utilizării acestuia; folosirea unor temperaturi la fabricarea filmelor sub cele de degradare a β -glucanilor ori a compușilor bioactivi din diverse sucuri naturale din fructe pentru a menține stabilitatea termică; o dizolvare rapidă pentru dispersia în lichide a componentilor din film și a suplimentului-pudră ambalat; o grosime și densitate suficient de mare astfel încât viteza de transmitere a vaporilor de apă prin film să nu influențeze caracteristicile suplimentelor ambalate; un conținut de umiditate scăzut și o activitate a apei redusă pentru a împiedica reacțiile de deteriorare microbiologică în produs; absența fisurilor la nivel microscopic care s-ar putea extinde pe durata de depozitare și nu în ultimul rând, fără modificări majore la nivel molecular ale ingredientelor folosite.

Pregătirea soluției formatoare de film (FFS) și turnarea s-au realizat în primul rând prin adăugarea β -glucanilor (cu un anumit conținut cunoscut în substanță uscată) pentru a obține echivalenți a 0.5, 1, 1.5 g s.u. După aceasta alginatul de sodiu a fost adăugat în cantități variabile conform protocolului de pregătire al soluției. Alginatul de sodiu (ca gelifiant) trebuie ales cu grijă astfel încât concentrația soluției formatoare de film să nu fie prea vâscoasă. Mancini et al., (1996) prin investigarea soluțiilor polimerice de alginat de sodiu au concluzionat că pentru un comportament pseudoplastic, soluțiile de alginat de sodiu ar trebui să se încadreze între 0.125 și 1.5% (g/v) (pe o plajă a temperaturilor de 5-35 °C). Astfel, pentru prepararea filmelor, cea mai ridicată cantitate de alginat de sodiu utilizată a fost de 1 g în soluția formatoare de film de 150 mL, corespunzătoare la 0.66 % (g/v). Pentru verificarea datelor, Figura 9A și B prezintă comportamentul reologic al celei mai concentrate soluții de alginat de sodiu realizate într-un volum de 150 mL apă distilată.

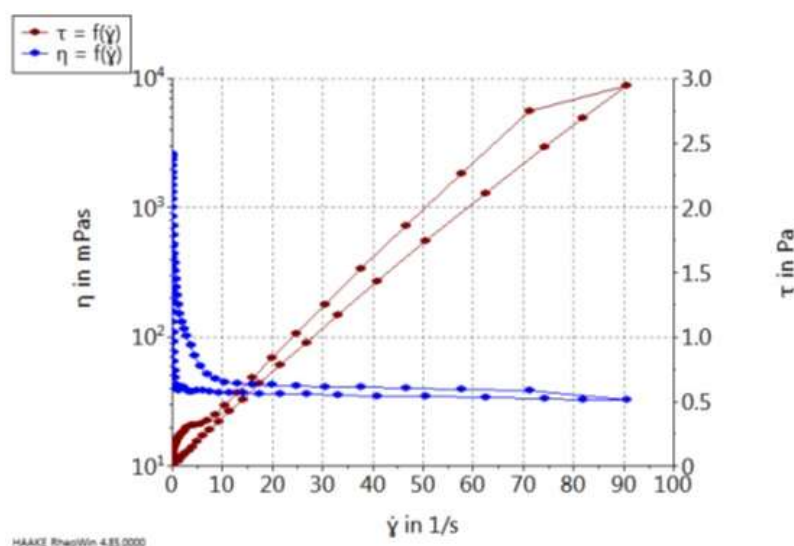


Figura 9 A. Comportamentul reologic al soluției de alginat de sodiu, η – funcția de vâscozitate, mPas; τ – tensiunea de forfecare, Pa; γ – viteză de forfecare, 1/s.

După cum poate fi observat în Figura 9A, profilul de vâscozitate al soluției polimerice (curba de curgere cu albastru) este unul descendent, odată cu creșterea tensiunii de forfecare aplicată (comportament ne-Newtonian), în primele 0.1 s se observă o scădere abruptă în valoarea vâscozității. La revenire, prin scăderea vitezei de forfecare, vâscozitatea rămâne constantă fără a se observa un caracter dilatant. Acest comportament pseudoplastic care conduce la fluidificarea sistemului polimeric la forfecare este deosebit de important în dozarea și dispersarea ingredientelor

într-o soluția formatoare de film când este supusă amestecării, având o influență asupra obținerii filmelor. Din analiza reologică putem concluziona că soluția de alginat de sodiu respectă regula Cox-Merz, unde vâscozitatea (η , mPas³) este dependentă de viteza de forfecare (γ , 1/s) (Roland, 2013).

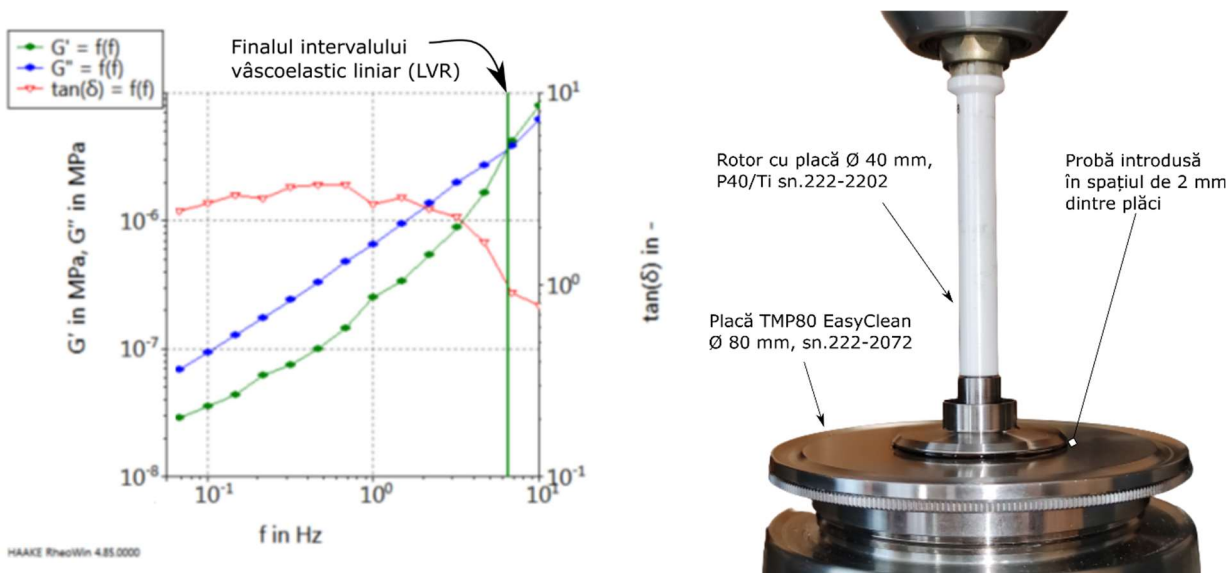


Figura 9B. Modulul elastic (G') și modulul vâscos (G'') în teste de scanare ca funcție de frecvență (Hz) pentru proba de alginat de sodiu; C. Ansamblul și geometria placă-placă.

Proprietățile vâscoelastice au fost și ele analizate, Figura 9B oferă detalii despre modulul elastic și modulul vâscos al soluției de alginat de sodiu. După cum se poate observa, modulul vâscos (G'') a prezentat valori net superioare modulului elastic (G') până la finalul intervalului vâscoelastic liniar (LVR), semn că soluția polimerică prezintă un caracter vâscos. Ambele module (G' și G'') sunt funcție de frecvență (Hz), iar prin creșterea treptată a celor două, odată cu frecvența, sunt furnizate informații despre structura gelului polimeric. Astfel, la frecvențe mici (10^{-1} Hz) lanțurile de polimer au avut mai mult timp pentru relaxare și pentru a forma lanțuri încurcate însă odată cu creșterea frecvenței către 10 Hz lanțurile de alginat se desfac în ancore aleatoare (Ma et al., 2014).

După dozarea β -glucanilor și a alginatului de sodiu în vase, a fost adăugată glicerina ca 25% (g/g) în raport cu greutatea totală a substanțelor solide din amestec. După adăugarea de apă distilată și acolo unde a fost cazul de ulei de soia ca surfactant, probele au fost supuse încălzirii la 80 °C timp de 30 min sub agitare continuă la 900 rpm pentru a forma o soluție omogenă. Cu 15 minute înainte de finalizarea procesului de agitare, pentru înglobarea în soluția formatoare de film și pentru o ușoară sterilizare, sucii au fost adăugați în paharele Erlenmeyer.

Amestecurile obținute au fost turnate în plăci Petri din plastic cu diametru de 8.6 cm. Câte 30 mL din fiecare soluție formatoare de film au fost dispersate pe plăcile Petri iar mai apoi au fost supuse uscării la 40 °C în etuva cu ventilație timp de 48 h. Filmele uscate au fost depozitate la temperatura camerei (24 °C) și o umiditate relativă a aerului de ~31% RH până la analiza acestora. Din soluția preparată s-au putut realiza câte patru pelicule din care s-a procedat la analiza lor.

În **capitolul V** este prezentat studiul filmelor bioactive prin dezvoltarea a 15 filme care au variat prin conținutul de β -glucan (de 0.5, 1 și respectiv 1.5 g), prin cantitatea de alginat de sodiu

³ 1 Pascal $\times$ secundă (Pas) = 10 Poise

(de 0.2, 0.4 și 0.6 g) și prin conținutul de suc de rodie cuprins între 10 și 30 mL. Rezultatele experimental-obținute precum și matricea de proiectare a filmelor din β -glucan, alginat de sodiu și suc de rodie sunt reprezentate în Tabelul 5. Rezultatele experimentale au arătat că grosimea și densitatea filmelor din β -glucan sunt dependente de factori precum cantitatea de β -glucan și alginat de sodiu în timp ce volumul de suc de rodie introdus are un impact ridicat asupra stratului. Cea mai mare grosime se regăsește la proba 1-0.6-30 cu 147.30 μm , având un conținut de 1 g β -glucan, 0.6 alginat de sodiu și 30 mL suc de rodie. Pe de altă parte, cea mai mică valoare a grosimii se întâlnește la filmul 0.5-0.4-10 cu 64.40 μm , având 0.5 g β -glucan, 0.4 alginat de sodiu și 10 mL suc de rodie.

Viteza de transport a vaporilor de apă prin filme (WVTR) este cuprinsă între 22.3472 $\text{g}\times\text{h}^{-1}\times\text{m}^{-2}$ și 32.1869 $\text{g}\times\text{h}^{-1}\times\text{m}^{-2}$. Astfel, din ecuația modelului pentru WVTR ($28.17-1.02X_1+1.07X_2+3.1X_3-0.2371X_1X_2-0.2039X_1X_3-0.1092X_2X_3+0.8638X_1^2-0.64X_2^2-1.2X_3^2$; $R^2 = 0.9824$; $p < 0.05$; valoarea lui $F = 30.92$) observăm că cea mai însemnată creștere a vitezei de transmitere a vaporilor de apă prin filme se produce datorită unui nivel crescut de suc de rodie ($3.1X_3$) și este urmată de conținutul de alginat de sodiu. În schimb, valorile WVTR variază invers proporțional cu cantitatea de β -glucan ($-1.02X_1$). Rezultatele asupra permeabilității la vaporii de apă (WVP) au indicat că cea mai mare valoare de 1.8657 $\text{g}\times\text{mm}\times\text{kPa}^{-1}\times\text{h}^{-1}\times\text{m}^{-2}$ este întâlnită la filmele cu 1 g β -glucan, 0.6 g alginat de sodiu, 30 mL suc de rodie și o grosime de 147.3 μm , iar cea mai scăzută valoare a fluxului de vaporii de apă prin film de 0.6780 $\text{g}\times\text{mm}\times\text{kPa}^{-1}\times\text{h}^{-1}\times\text{m}^{-2}$ a fost găsită la proba cu 10 mL suc de rodie, 0.4 g alginat de sodiu și 0.5 g β -glucan. Figura 10 prezintă suprafețele de răspuns a influenței compoziției asupra parametrilor WVTR și WVP.

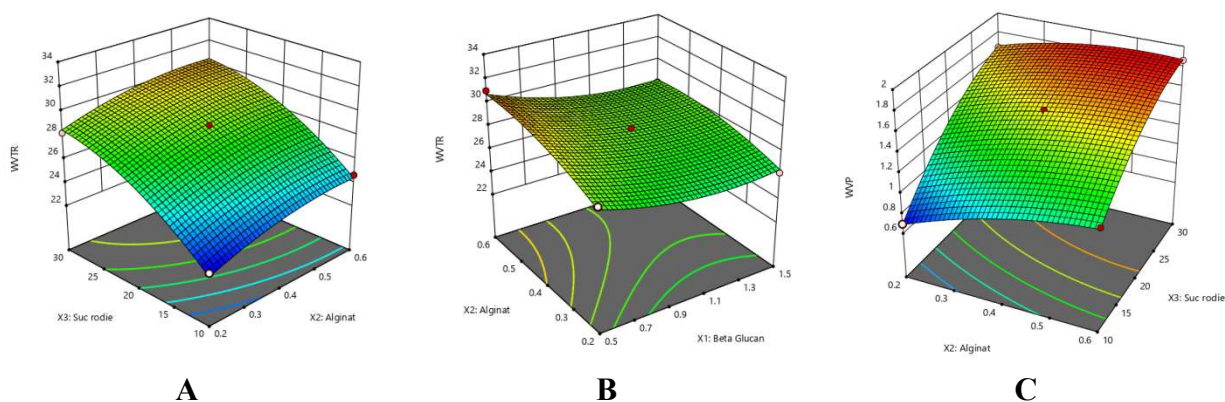


Figura 10 Suprafețele 3-D ale variabilelor independente asupra WVTR și WVP. **A.** Efectul alginatului de sodiu și sucului de rodie asupra vitezei vaporilor de apă ce pătrund prin film (WVTR); **B.** Efectul alginatului de sodiu și β -glucanilor asupra WVTR; **C.** Efectul alginatului de sodiu și a sucului de rodie asupra WVP.

Astfel, din ecuația pentru WVP ($WVP = 1.58+0.0924X_1+0.1673X_2+0.4238X_3-0.1566X_1X_2-0.1233X_1X_3-0.064X_2X_3-0.0637X_1^2-0.0799X_2^2-0.1538X_3^2$; $R^2 = 0.9950$; $p < 0.05$; $F\text{-value} = 109.58$) se observă că o creștere a valorilor este direct proporțională cu cantitatea de suc de rodie, alginat de sodiu și într-o mică măsură cu β -glucanii adăugați ($0.0924X_1$). Când este de dorit o valoare scăzută a fluxului de vaporii de apă prin film, suc de rodie și cantitatea de alginat de sodiu trebuie reduse (Figura 10C).

Tabelul 5. Matricea de proiectare de ordinul doi utilizată pentru a evalua efectele variabilelor procesului și valorile răspunsurilor experimentale pentru filmele din β -glucan, alginat de sodiu și suc de rodie.

Variabile					Răspunsuri									
Nr.	β-glucan (g)	Algina t de sodiu (g)	Suc de rodie (mL)	de	Grosime (μm)	Densitate (g×cm ⁻³)	WVTR (g×h ⁻¹ ×m ⁻²)	WVP (g×mm×kPa ⁻¹ ×h ⁻¹ ×m ⁻²)	Umiditate (%)	Opacitate (Abs×mm ⁻¹)	Solubilitate (minute)	L*	a*	b*
	X ₁	X ₂	X ₃											
1	0.5	0.2		20	88.6	1.53	28.3377	1.0565	17.59	4.75	3.42	29.51	0.23	1.7
2	0.5	0.4		10	64.4	1.46	25.0188	0.6780	17.72	7.86	2.5	29.18	0.02	1.26
3	0.5	0.4		30	132.4	1.69	32.1869	1.7932	17.86	2.77	4.2	32.11	0.35	1.54
4	0.5	0.6		20	129.7	1.55	31.0122	1.6925	15.23	1.46	2.34	27.83	-0.01	1.59
5	1	0.2		10	73.9	1.41	22.3472	0.6949	16.25	10.51	4.51	31.21	-0.02	1.16
6	1	0.2		30	138.7	1.66	28.2248	1.6473	16.20	1.81	5.38	31.86	0.47	1.63
7	1	0.4		20	135.2	1.57	27.8893	1.5866	13.98	3.55	4.07	33	0.26	1.76
8	1	0.4		20	133.7	1.52	27.7534	1.5614	14.02	3.84	4.41	33.07	0.28	1.71
9	1	0.4		20	130.5	1.59	28.8807	1.5859	13.89	3.82	5.19	33.13	0.34	1.81
10	1	0.6		10	112.7	1.45	24.6596	1.1694	12.93	5.47	3.11	33.36	0	1.5
11	1	0.6		30	147.3	1.71	30.1003	1.8657	15.04	3.03	4.25	32.59	0.44	1.76
12	1.5	0.2		20	134.8	1.60	26.2584	1.4894	13.92	4.07	5.22	33.31	0.2	1.56
13	1.5	0.4		10	116.6	1.42	23.8945	1.1723	12.31	5.08	6.33	33.43	-0.01	1.45
14	1.5	0.4		30	141.3	1.67	30.2471	1.7984	18.49	3.64	4.5	27.62	0.34	2.38
15	1.5	0.6		20	127.3	1.58	27.9846	1.4990	14.99	1.91	4.22	30.84	0.6	1.76

Pentru proiectarea compoziției optime, fiecare răspuns a fost optimizat individual prin utilizarea softului de încercare Design Expert. Un optim nu se poate regăsi în punctul staționar în care panta suprafeței de răspuns este redusă la zero în toate direcțiile. De aceea, spre exemplu este de dorit ca transportul vaporilor de apă prin filme să fie unul cât mai redus și astfel WVTR și WVP vor trebui să fie mici. Un film cu o grosime ridicată dar totodată transparent așa încât filmul să permită pătrunderea radiației vizibile în produsul ambalat este de asemenea de dorit. Mai mult decât atât pentru a asigura o dispersie cât mai rapidă a produselor ambalate în lichide este recomandat ca ambalajul dezvoltat să prezinte o solubilitate crescută. S-a luat în considerare și densitatea filmului deoarece un film cu densitate crescută înseamnă și un film cu o structură mult mai compactă și poate fi atribuit unor proprietăți mai bune de barieră împotriva apei. Culoarea probelor nu a variat semnificativ pentru a putea fi luată în calculul funcției de optimizare și a fost lăsată în intervalul precizat. Valorile optime pentru fiecare răspuns în parte au fost constrânse pe intervale stabilite de minim sau maxim. Prin funcția de optimizare a fiecărui răspuns selectat și adaptată după intervalele obținute din datele experimentale, cel mai bun film cu caracteristicile dorite mai sus și care să aducă un aport suficient de β -glucan și suc de rodie s-ar putea obține prin utilizarea de 0.98 g β -glucan, 0.6 g alginat de sodiu și 14.80 mL suc de rodie.

Validarea și confirmarea datelor prezise computațional s-a procedat prin dezvoltarea unui film având în compoziție 1 g β -glucan, 0.6 g alginat de sodiu și 14 mL suc de rodie (denumit în continuare proba 1-0.6-14). Cantitatea de glicerină introdusă în compoziția acestui film a fost de 0.83 g (25% din substanța uscată). În acest sens s-au reluat toate analizele specifice (grosime, densitate, WVTR, WVP, densitate, opacitate, solubilitate, umiditate, culoare, activitatea apei, duritate) pentru a observa dacă au existat schimbări semnificative între datele obținute și cele simulate cu ajutorul programului Design Expert.

În plus pentru proba optimă, s-a realizat o evaluare a transmisiei luminii pe întreg domeniul spectral ultraviolet-vizibil (200-800 nm) cu ajutorul spectrofotometrului UV-VIS-NIR Shimadzu 3600 (Tokyo, Japan), s-au efectuat teste microbiologice pentru identificarea posibilor agenți patogeni utilizând plăcile Compact Dry și în final s-a realizat o analiză a microstructurii filmului cu ajutorul microscopului cu scanare electronică SEM.

Rezultatele prezise și rezultatele experimental-determinate în urma analizelor de laborator efectuate sunt evidențiate în tabelul următor:

Tabelul 6. Caracteristicile probei optime în urma analizelor de laborator.

	Valori prezise	Valori determinate experimental
Compoziția probei	0.98 g β -glucan, 0.6 g alginat, 14.80 mL suc de rodie (compoziție prezisă a fi optimă)	1 g β -glucan, 0.6 g alginat, 14 mL suc de rodie, 0.83 g glicerină (compoziție probă realizată experimental 1-0.6-14)
Grosime (μm)	127.25	121.4
Densitate ($\text{g}\times\text{cm}^{-3}$)	1.506	1.47
WVTR ($\text{g}\times\text{h}^{-1}\times\text{m}^{-2}$)	26.774	27.1224
WVP ($\text{g}\times\text{mm}\times\text{kPa}^{-1}\times\text{h}^{-1}\times\text{m}^{-2}$)	1.437	1.390
Umiditatea (%)	12.76	14.59
Opacitate (%)	3.209	4.48
Solubilitate (minute)	3.39	4.53
L	32.62	36.45
a^*	0.189	-0.05
b^*	1.56	2.54
a_w	nd	0.2287

După cum poate fi observat, rezultatele experimentale sunt strâns legate de datele obținute din analiza de optimizare folosind funcția de dezirabilitate. Proba optimă a fost validată prin efectuarea analizelor de laborator având ca rezultate: WVTR de $27.1224 \text{ g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$, WVP de $1.390 \text{ g} \times \text{mm} \times \text{kPa}^{-1} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$, grosime a filmului de $121.4 \text{ } \mu\text{m}$, densitate de $1.47 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$, opacitate de 4.48% , conținut în umiditate de 14.59% , solubilizare în 4.53 minute și o valoare a culorii pentru $L^*=36.45$, $a^*=-0.05$ și $b^*=2.54$. De asemenea activitatea apei determinată la $25.06 \text{ } ^\circ\text{C}$ a fost de 0.2287 și se încadrează sub limita de dezvoltare microbiană.

Figura 11 expune transmisia luminii (linia cu roșu și indicată prin cifra 1) ce trece prin film, iar cu cifra 2 absorbția luminii pe domeniul $200\text{-}800 \text{ nm}$ (linia cu negru). Se poate observa clar că transmisia prin probă pe domeniul $200\text{-}400 \text{ nm}$ este 0 , semn că radiația ultraviolet este blocată de filmul ce are în compoziție β -glucan, alginat de sodiu și suc de rodie. Pe măsură ce lungimea de undă crește ($400\text{-}800 \text{ nm}$) transmisia luminii în domeniul vizibil devine exponențială.

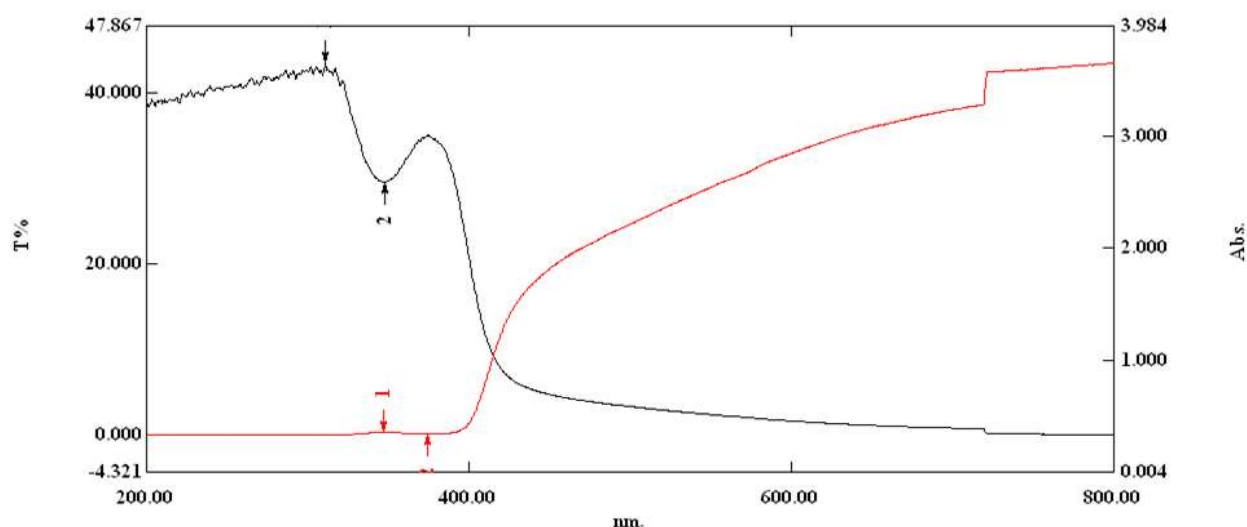


Figura 11. Spectrul de absorbție și transmisie al probei optime pe domeniul $200\text{-}800 \text{ nm}$.

Calitatea microbiologică a filmelor prin testarea cu ajutorul filmelor cromogenice Compact Dry (Figura 12) a evidențiat că niciun microorganism supus screening-ului precum bacteriile coliforme, bacteriile aerobe mezofile, *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* ori enterococi nu s-au dezvoltat pe mediile de cultură selective. De altfel, rezultatele sunt susținute și de cercetările din literatura de specialitate asupra β -glucanilor din drojdie care sunt recunoscuți a exercita activitate puternic antibacteriană împotriva a două bacterii Gram-pozitive (*B. cereus* și *S. aureus*) și asupra a trei tipuri de bacterii Gram-negative (*E.coli*, *Salmonella*, *P.vulgaris*) (Khan et al., 2016). Activitate antibacteriană o exercită și suc de rodie asupra unui spectru larg de bacterii și se consideră că prezintă un efect inhibitor mai puternic decât tetraciclina împotriva *Pseudomonas aeruginosa* (Wu et al., 2022).

Imagistica SEM a fost utilizată pentru a observa microstructura filmului optim din β -glucan, alginat de sodiu și suc de rodie. Pentru aceasta, filmul obținut (Figura 13A) a fost expus unei tensiuni de accelerare de 30 kV pe două unghiuri diferite și anume: s-a realizat o scanare pe suprafața plană a filmului (Figura 13B) pentru a identifica dacă există eventuale perforații sau micropori în structura acestuia și o scanare în secțiune transversală (Figura 13C) pentru identificarea eventualelor microfisuri.



Figura 12. Mediile de cultură selective uscate pe care s-au efectuat analizele microbiologice:
Nu există colonii vizibil-dezvoltate în proba optimă.

După cum se poate observa din Figura 13B, pe suprafața plană a filmului micrograțiile SEM nu au reliefat puncte de perforație, micropori ori microfisuri prin care să aibă loc un schimb de vapori de apă sau gaze mai pronunțat. Atât vizibil cât și la nivel microscopic (Figura 13A-C) se poate observa o distribuție uniformă în structura filmului, fără existența de conglomerate. Rezultatele confirmă că o grosime de aproximativ 120 μm oferă o uniformitate a filmului, iar prin absența porilor face ca membrana să fie eficientă ca barieră împotriva vaporilor de apă.

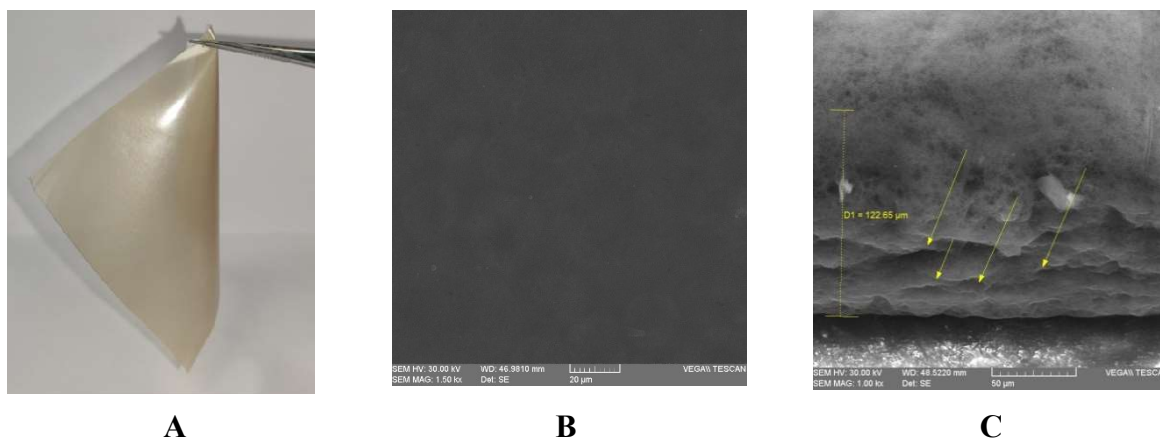


Figura 13. Micrograțiile SEM și imaginea filmului cu 1 g β -glucan, 0.6 g alginat de sodiu și 14 mL suc de rodie: **A** Filmul optim obținut (1-0.6-14); **B** Scanare perpendiculară pe suprafața filmului (plană) pentru identificarea perforațiilor și microporilor (1.5 kx); **C** Scanare în secțiune transversală a filmului pentru identificarea microfisurilor (1 kx).

Pe de altă parte în timp ce suprafața plană a filmului prezintă o structură continuă, micrografiile SEM în secțiune transversală (Figura 13C) prezintă straturi longitudinale asociate uscării precum și unele discontinuități care sunt cel mai probabil asociate tăierii filmului. Micile fisuri paralele, longitudinale, indicate prin săgețile galbene se pot iniția, răspândi și duc la ruperea filmului în absența unui plastifiant. De aceea se recomandă utilizarea a 0.83 g glicerină în filmul optim.

Datorită caracterului hidrofil al alginatului de sodiu, filmele dezvoltate pot fi ușor lipite prin umectarea cu apă a marginilor. În funcție de rezultatele obținute experimental, filmul cu un conținut cunoscut de β -glucan, alginat de sodiu și suc de rodie a fost utilizat ca ambalaj pentru produse medicamentoase de natură pulverulentă pentru soluție orală. Produsul pulverulent a fost poziționat în centrul filmului iar mai apoi filmul a fost sigilat fără ca pulberea să intre în contact cu marginile umectate. Flexibilitatea ridicată a filmului permite obținerea de ambalaje sub diferite forme. Astfel, Figura 14A, B și C prezintă o formă pătrată, circulară ori hexagonală realizate prin suprapunerea a două filme în interiorul căreia este prezentă pulberea, în timp ce în Figura 14D prezintă un ambalaj dezvoltat prin îndoirea unui singur film și tăierea acestuia sub formă triunghiulară. Filmul din Figura 14E este model al unui ambalaj bicomponent prin care s-au împachetat 2 tipuri de produse de natură pulverulentă, iar Figura 14F prezintă ambalajul optim în care s-a introdus vitamina C prin suprapunerea a două filme și sudarea acestora cu ajutorul apei.

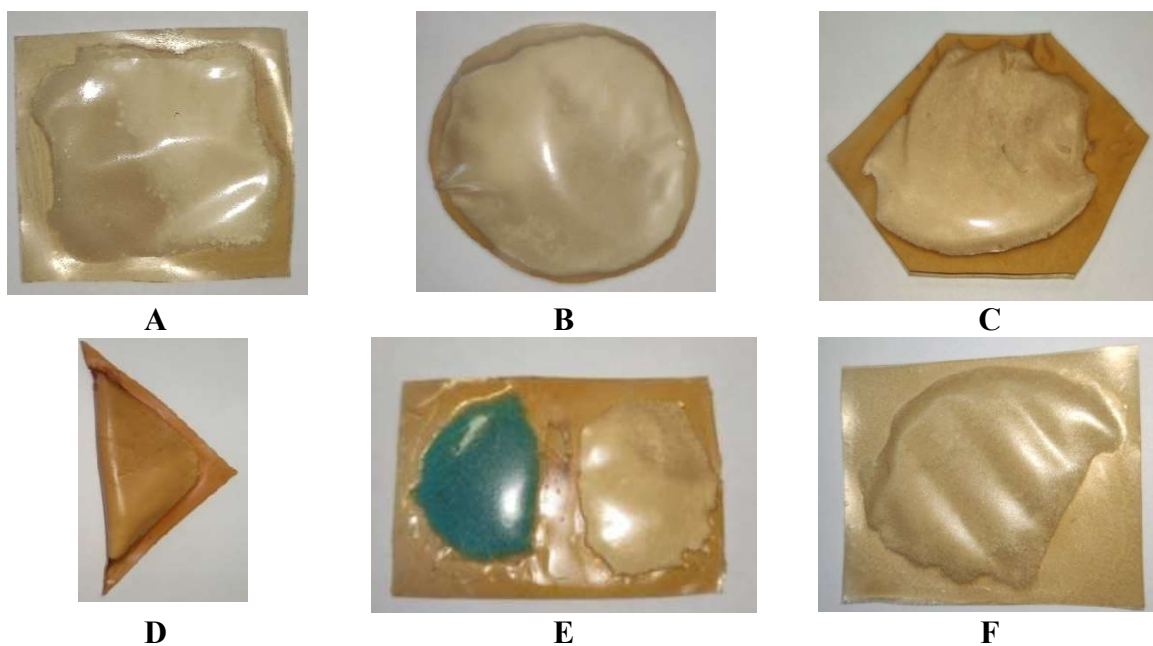


Figura 14. Diverse forme de ambalare a suplimentelor alimentare/ medicamente pulverulente în filmele cu β -glucan, alginat de sodiu și suc de rodie pentru soluție orală: **A** Formă pătrată; **B** Circulară; **C** Hexagonală; **D** Triunghiulară; **E** Ambalaj bicomponent; **F** Filmul optim având ambalat acidul ascorbic (vitamina C).

Figura 15 prezintă dinamica de dizolvare a ambalajului 14F ce conține acid ascorbic ca produs farmaceutic pulverulent.



Figura 15. Diamica de dizolvare a ambalajului F dezvoltat ce conține acid ascorbic ca produs farmaceutic pulverulent.

Capitolul VI, Studiu privind dezvoltarea filmelor bioactive cu dizolvare rapidă pe bază de β -glucan și suc de afine a avut în vedere reducerea timpului de dizolvare ceea ce ar permite eliberarea mai rapidă a compușilor bioactivi și o dispersare cât mai omogenă a compușilor ambalați. Afinele (*Vaccinium myrtillus* L.) sunt una dintre cele mai cunoscute și importante fructe utilizate în controlul diabetului datorită efectului hipoglicemiant al flavonoidelor regăsite în compoziție. Efectul antidiabetic al afinelor este unul extrem de complex și este descris pe larg de către Chehri et al., (2022) într-un studiu ce vizează proprietățile farmacologice ale compușilor din afine. Nu mai puțin de 58 compuși fenolici au fost identificați prin tehnici precum UPLC-MS și HPLC-DAD, în suc regăsindu-se un total de 440 mg antociani și 65 mg flavonoli/100 mL (Laaksonen et al., 2010). Printre compușii fitochimici cu efect hipoglicemic putem enumera: acidul clorogenic, derivați ai acidului cafeolchinic și quercitină de tip glicozidă (Chehri et al., 2022; Huang et al., 2018).

Scăderea timpului de dizolvare de la 180 secunde la 60 s a fost stabilit de către Farmacopeea Europeană pentru standardele de dizolvare rapidă a unui film (Dahmash et al., 2021). Din analiza studiilor de specialitate reiese că adaosul unui surfactant precum: lauril sulfat de sodiu, polisorbați, clorura de benzaconiu, ulei de soia, etc. prezintă o importanță deosebită ca solubilizant sau agent de umectare și dispersie așa încât filmul să se dizolve în câteva secunde (Arya et al., 2010; Xu et al., 2011).

Tabelul 7. Compoziția propusă pentru soluția formatoare de film din β -glucan și suc de afine.

Proba	β -glucan (BG), g	Alginat de sodiu (AS), g	Suc afine (SA), g	Substanță uscată suc de afine (determinată), g	Conținut total solide (BG+AS+SA), g	Glicerină, 25% (g/g) din totalul solidelor, g	Ulei de soia, 2% (g/g) din totalul solidelor, %	Apă distilată, până la volum de, mL
1	1	0.8	10	1.15	2.95	0.7375	0	150
2	1	0.8	10	1.15	2.95	0.7375	2	150
3	1	0.8	20	2.3	4.10	1.0250	0	150
4	1	0.8	20	2.3	4.10	1.0250	2	150
5	1.5	0.8	10	1.15	3.45	0.8625	0	150
6	1.5	0.8	20	2.3	4.60	1.1500	0	150
7	1.5	0.8	20	2.3	4.60	1.1500	2	150

Din datele prezentate în Tabelul 7 poate fi observat că în toate cele șapte probe a fost introdusă o cantitate egală de alginat de sodiu care în raport cu volumul total prezintă o concentrație de 0.53 % (g/v). Aceasta se încadrează în limitele 0.125-1.5% și prezintă un comportament pseudoplastic de curgere. Plastifiantul cu cea mai bună compatibilitate (glicerina) față de β -glucan și cel mai popular pentru filmele pe bază de antociani (Neves et al., 2022; Novák et al., 2012) a fost adăugat în toate probele în timp ce uleiul de soia a fost inclus în trei dintre probe, ca 2% (g/g) din totalul substanțelor solide (β -glucan, alginat de sodiu, suc de afine).

Grosimea filmelor exprimată în μm este o caracteristică importantă pentru materialele de ambalare. Diferitele grosimi sunt esențiale pentru alte proprietăți, cum ar fi bariera la vaporii de apă, transparența sau atributele de culoare (Alizadeh-Sani et al., 2021; Lim et al., 2021). Grosimea filmului de β -glucan/suc de afine variază între 66.43 și 119.7 μm (Tabelul 9) și a fost semnificativă ($p < 0.001$) în funcție de conținutul total de solide din soluția formatoare de film. Acest comportament este în concordanță cu observațiile lui Arham et al., (2016) care au observat o dependență între grosimea filmului și compoziția inițială (Arham et al., 2016). Rezultate similare au fost obținute de Peltzer et al., (2018) și Zhao et al., (2022) unde, grosimi până la valori de 200 μm au contribuit la stabilitatea și uniformitatea filmului făcându-l potrivit pentru aplicații de ambalare (M. A. Peltzer et al., 2018; Zhao et al., 2022).

WVTR a filmelor din β -glucan și suc de afine prezintă în general valori scăzute, cuprinse între 3.2562 și 7.1111 $\text{g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$. S-a observat că tendința de creștere a WVTR a fost determinată de creșterea conținutului total de substanțe introduse în soluția formatoare de film. Mai mult, studiile întreprinse de Rahmawati et al., (2020) au indicat că o influență puternică asupra vitezei de absorbție a apei o are cantitatea de plastifiant. Datorită naturii hidrofile a glicerinei ce posedă trei grupe hidroxil, în Tabelul 8 a fost investigat influența plastifiantului asupra vaporilor de apă ce pătrund prin film.

Tabelul 8. Efectul glicerinei asupra WVTR

Probă	Cantitate de glicerină, g	WVTR, ($\text{g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$)
S1, S2	0.7375	3.7048 (0.19) ^b
S5	0.8625	6.8927 (0.68) ^a
S3, S4	1.025	4.5887 (1.5) ^b
S6, S7	1.15	6.5073 (0.84) ^a
		F-value 12.14***

*** Statistic semnificativ la $p < 0.001$. ^{a-b} Litere diferite în aceeași coloană indică diferențe semnificative.

Într-adevăr, WVTR prezintă o tendință de creștere cu conținutul în glicerină. Valoarea maximă de 7.1111 $\text{g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$ (Tabelul 7) prezintă și cel mai ridicat conținut de 1.15 g glicerină în soluția formatoare de film. Proba 7 cu același conținut de glicerină prezintă o valoare scăzută a WVTR-ului de 5.9036 $\text{g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$. Datorită uleiului de soia, recunoscut pentru natura hidrofobică, WVTR-ul a prezentat o valoare scăzută. În lipsa acestuia, interacțiunile intermoleculare sunt diminuate, mobilitatea moleculelor favorizează migrarea vaporilor de apă prin membrane și astfel valorile vitezei pentru WVTR cresc așa cum este cazul Probei 6 (7.1111 $\text{g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$).

Tabelul 9. Caracteristicile fizico-chimice ale filmelor cu β -glucani și suc de afine.

Parametri fizico-chimici	Filme din β -glucan/ suc de afine							F-Value
	Proba 1	Proba 2	Proba 3	Proba 4	Proba 5	Proba 6	Proba 7	
Grosime (μm)	66.43 (8.53) ^d	73.03 (6.03) ^{cd}	112.06 (6.66) ^a	68.96 (9.51) ^d	83.73 (7.57) ^c	119.7 (9.39) ^a	97.8 (6.48) ^b	22.24***
WVTR ($\text{g}\times\text{h}^{-1}\times\text{m}^{-2}$)	3.7956 (0.2) ^c	3.6140 (0.16) ^c	3.2562 (0.35) ^c	5.9213 (0.48) ^b	6.8927 (0.68) ^a	7.1111 (0.62) ^a	5.9036 (0.56) ^b	34.4***
WVP ($\text{g}\times\text{mm}\times\text{kPa}^{-1}\times\text{h}^{-1}\times\text{m}^{-2}$)	0.1057 (0.009) ^e	0.1107 (0.004) ^{de}	0.1542 (0.02) ^{cd}	0.1710 (0.01) ^c	0.2442 (0.04) ^b	0.3568 (0.01) ^a	0.2432 (0.03) ^b	38.82***
L	31.41 (0.34) ^{bcd}	30.33 (1.37) ^{cd}	29.63 (1.09) ^d	32.21 (0.80) ^{bc}	35.69 (0.58) ^a	35.5 (1.67) ^a	32.38 (1.53) ^b	11.55***
a*	1.19 (0.06) ^{de}	1.35 (0.07) ^d	2.82 (0.21) ^a	2.00 (0.1) ^b	1.16 (0.02) ^c	1.75 (0.1) ^c	2.03 (0.03) ^b	94.41***
b*	1.25 (0.02) ^{de}	1.69 (0.11) ^{ab}	1.40 (0.18) ^{cd}	1.11 (0.07) ^e	1.53 (0.09) ^{bc}	1.53 (0.18) ^{bc}	1.79 (0.2) ^a	8.38***
Opacitate ($\text{Abs}\times\text{mm}^{-1}$)	0.39 (0.09) ^d	0.64 (0.007) ^c	0.85 (0.12) ^{bc}	1.11 (0.19) ^a	1.21 (0.02) ^a	1.05 (0.04) ^{ab}	1.14 (0.21) ^a	17.38***
Solubilitate (s)	36.66 (1.52) ^c	22.33 (0.57) ^f	94 (3.6) ^b	46.33 (1.52) ^d	35.33 (2.51) ^e	105.66 (2.08) ^a	50.33 (1.52) ^c	674.08***
a _w	0.3562 (0.004) ^d	0.3623 (0.003) ^{cd}	0.3584 (0.002) ^d	0.3606 (0.006) ^d	0.3915 (0.0006) ^a	0.3690 (0.003) ^c	0.3765 (0.003) ^b	28.22***
U (%)	11.14 (0.13) ^d	10.19 (0.24) ^e	13.69 (0.29) ^b	11.16 (0.22) ^d	14.32 (0.16) ^a	11.89 (0.12) ^c	14.39 (0.29) ^a	181.03***

În afară de grosime ($n=30$), fiecare probă este o medie a trei repetiții $\pm$ deviația standard ($n=3$). *** Statistic semnificativ la $p<0.001$. a-f literele diferite în aceeași rânduri indică diferențe semnificative între probe. WVTR – viteza transmitere a vaporilor de apă; L, a*, b* – profilul de culoare; a_w – activitatea apei; U – conținut de umiditate.

Comparativ cu alte filme realizate pe bază de suc de afine, care prezintă valori cuprinse între 52.91-61.87 $\text{g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$ în funcție de concentrația de afine (Dordevic et al., 2021), valoarea WVTR a probelor a prezentat un minim de 3.2562 $\text{g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$. Adăugarea de β -glucan sau pululan în filme a arătat de asemenea proprietăți îmbunătățite de barieră împotriva apei (Chang et al., 2019b). Valorile obținute sunt de 32 de ori mai mari decât valorile unui film din polietilenă de joasă densitate (LDPE) care prezintă o valoare de doar 0.1012 $\text{g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$, determinată de către Reesha et al., (2015). Chiar și așa, pentru un film bioactiv cu potențiale aplicații pentru produse de ambalare a prezentat cele mai bune proprietăți de barieră.

Unul dintre cel mai important aspect în dezvoltarea unui film cu dizolvare rapidă este reprezentat de timpul de dizolvare care nu trebuie să depășească un minut (Cilurzo et al., 2008). Diferențe semnificative între probe ($p < 0.001$) au fost observate în Tabelul 10 cu o variație mai mare între mediile eșantionului în raport cu variația din cadrul acestora (o valoare a lui F de 674.08). Valorile timpilor de dizolvare variază între 22.33 și 105.66 secunde. Acest lucru se datorează compoziției soluției formatoare de film. În timp ce uleiul de soia se comportă ca un bun surfactant (Xu et al., 2011), Rodriguez et al., (2006) au investigat efectul combinat al plastifiantilor și surfactanților asupra proprietăților fizico-chimice ale filmelor. Autorii au concluzionat că agenții tensioactivi au îmbunătățit proprietățile de umectare al soluțiilor formatoare de film prin scăderea tensiunii superficiale, iar în combinație cu glicerina se permite o mobilitate moleculară mai mare (Rodríguez et al., 2006). Influența compoziției soluției filmogenice și a adaosului de surfactant asupra timpului de dizolvare este prezentată în Tabelul 10.

Tabelul 10. Influența β -glucanului, a uleiului de soia și a sucului de afine asupra timpului de dizolvare al filmelor.

Parametri fizico-chimici	Compoziția		
	β -glucan		
	1 g	1.5 g	F-value
Timp de dizolvare (s)	49.83 (28.14) ^a	63.77 (32.13) ^a	1.12 ^{ns}
	Ulei de soia		
	0%	2%	F-value
Timp de dizolvare (s)	67.91 (33.68) ^b	39.66 (13.16) ^a	5.62*
	Suc de afine		
	10 g	20 g	F-value
Timp de dizolvare (s)	31.44 (7.01) ^b	74.08 (27.35) ^a	20.06***

^{ns} – nesemnificativ; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; ^{a-b} litere diferite pe aceleași rânduri indică diferențe semnificative.

Din tabel se poate observa că încorporarea de β -glucan între 1 și 1.5 g în filme nu are o influență semnificativă asupra timpului de dizolvare ($p > 0.05$; $p = 0.3$). Pe de altă parte, analiza datelor a arătat că uleiul de soia și conținutul de suc de afine au o influență semnificativă asupra timpului de dizolvare a filmelor ($p < 0.05$ și respectiv $p < 0.001$). Valoarea F obținută de 20.06, semnificativă la 0.1%, indică faptul că există o influență semnificativă a sucului de afine asupra timpului de dizolvare. Un conținut mai mare de suc de afine a avut un efect negativ în ceea ce privește timpul de dizolvare al filmelor cu o medie de 74.08 s la 20 g față de 31.44 s la 10 g de suc de afine adăugat. În același timp, adăugarea a 2% ulei de soia în soluția formatoare de film a arătat o scădere semnificativă (nivel de semnificație de 5%) a timpului de dizolvare. Se poate concluziona

că, adaosul de surfactant influențează pozitiv timpul de dizolvare și acționează ca agent de solubilizare.

În timp ce analiza statistică a testelor de activitate a apei a arătat diferențe semnificative între probe ($p < 0.001$), datele indică valori restrânse cuprinse între 0.3562 și 0.3915, rezultate care se situează sub valorile critice la care poate apărea deteriorarea microbiologică. Majumdar et al., (2018) au rezumat într-o analiză faptul că este necesară o valoare minimă a activității apei de 0.6 pentru a iniția creșterea microorganismelor (Majumdar et al., 2018). Datele sunt de asemenea în concordanță cu cercetările lui Beuchat., (1983) care afirmă că sub 0.61 a_w nu poate exista o creștere microbiană, între 0.61 și 0.85 încep să se deterioreze alimentele cu formarea de drojdii și mușgaiuri, iar peste 0.85 se dezvoltă bacteriile (Beuchat, 1983).

Conținutul de umiditate, un alt parametru important în aplicațiile de ambalare, a variat între 10.19 și 14.39%. Umiditatea filmelor este strâns legată de cantitatea totală a moleculelor de apă din microstructura rețelei filmelor (Kanmani & Rhim, 2014). Abdalrazeq et al., (2019) au afirmat că un conținut de umiditate ridicat limitează considerabil utilizarea peliculelor pentru materialele de ambalare și au găsit cea mai mare valoare a umidității de 33.27% în probele de film care conțin 50% glicerină (Abdalrazeq et al., 2019).

În **capitolul VII** al cercetărilor privind dezvoltarea de filme bioactive s-a procedat la dezvoltarea de filme pe bază de β -glucan și suc de merișoare. Merișoarele (*Vaccinium vitis-idaea* L.) sunt în mod tradițional utilizate pentru tratamentul infecțiilor urinare, pentru tulburările gastro-intestinale ori în bolile neurodegenerative. Proprietățile antimicrobiene, antioxidante și efectele antiinflamatoare sunt exercitate în special de cei aproximativ 59 compuși identificați de către Vilkickyte et al., (2022) într-un studiu care au stabilit rolul important al quercitinei, catechinelor și flavonolilor din compoziția merișoarelor. Consumul de merișoare asupra metabolismului glucozei a prezentat în două studii diferite care au concluzionat că un răspuns glicemic scăzut este obținut datorită utilizării sucului de merișoare cu aport scăzut caloric comparativ cu alte sucuri (Rocha et al., 2019). Tot acel studiu a mai scos în evidență că un consum de 240 mL merișoare zilnic, pentru o perioadă de 12 săptămâni este benefic în controlul diabetului de tip II. Funcțiile vasculare pot fi vizibil îmbunătățite după o lună de consum datorită conținutului ridicat în polifenoli (în special proantocianidine de tip A, antociani, flavonoli și acizi fenolici) (Heiss et al., 2022).

Proiectarea amestecului pentru examinarea proprietăților filmelor s-a realizat conform Tabelului 11 menținând cantitatea de β -glucan între 1 și 1.5 g, alginatul de sodiu a fost adăugat câte 1 g în fiecare soluție formatoare de film, iar suc de merișoare a fost calculat astfel încât cantitatea totală a substanțelor solide să reprezinte 5 g în soluția formatoare de film (având determinată substanța uscată de 6.85% g/g).

Tabelul 11. Compoziția propusă pentru soluția formatoare de film din β -glucan și suc de merișoare.

Proba	β -glucan (BG), g	Alginat de sodiu (AS), g	Suc merișoare (SM), g	Substanță uscată suc de afine (determinată), g	Conținut total solide (BG+AS+SA), g	Glicerină, 25% (g/g) din totalul solidelor, g	Ulei de soia, 2% (g/g) din totalul solidelor, g	Apă distilată, până la volum de, mL
1	1	1	43.79	3	5	1.25	0	150
2	1	1	43.79	3	5	1.25	0.1	150
3	1.5	1	36.49	2.5	5	1.25	0	150
4	1.5	1	36.49	2.5	5	1.25	0.1	150

Raportul în glicerină a fost menținut la 25% ca și în cazul celorlalte probe dezvoltate, iar uleiul de soia a fost adăugat pentru studiu comparativ. Rezultatele măsurătorii grosimii în zece puncte pentru cele patru probe de film din β -glucan și suc de merișoare sunt prezentate în Tabelul 12.

Tabelul 12. Măsurătorile efectuate pentru determinarea grosimii filmelor.

Proba	Nr. măsurători										Media (μm) (n=10)
1	88	86	98	96	100	80	84	94	92	80	89.8
2	108	116	110	100	118	108	114	120	112	106	111.2
3	90	88	92	94	96	80	84	82	88	82	87.6
4	100	126	102	98	126	124	108	110	110	124	112.8

Se observă că probele 2 și 4 prezintă o grosime mai ridicată cu o medie de 112 μm comparativ cu probele 1 și 3 cu o medie 88.8 μm (n=20). Acest lucru este independent de cantitatea totală de solide și este influențat de adaosul de ulei de soia. Și în acest caz, după uscare, valorile sub 200 μm obținute fac din filme produși potriviți pentru aplicații de ambalare.

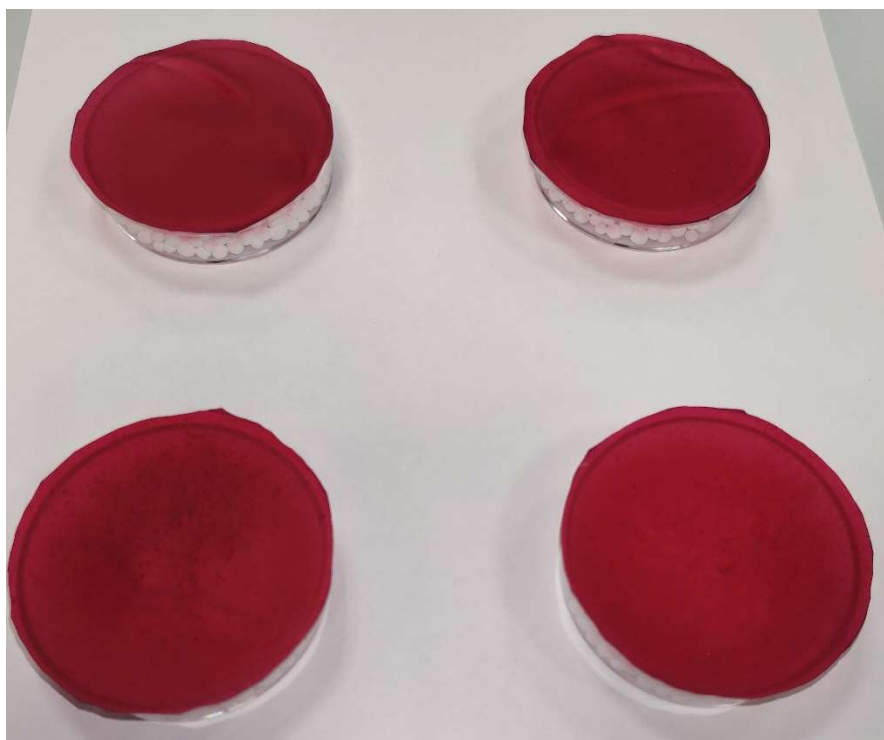


Figura 16. Probele de film din β -glucan/suc de merișoare dezvoltate.

WVTR, viteza de transmitere a vaporilor de apă prin filme a prezentat valori cuprinse între 7.6918 și 9.5588 $\text{g}\times\text{h}^{-1}\times\text{m}^{-2}$ de-a lungul celor 72 de ore de măsurare a greutății cutiilor Petri cu clorura de calciu ca desicant. Greutățile probelor analizate la fiecare 8 ore și coeficienții de determinare sunt prezentate în Tabelul 13.

Tabelul 13. Masa probelor de-a lungul celor 72 ore.

Ora/Probă	Greutate probă, g			
	1	2	3	4
0	16.9213	17.3339	15.2812	15.3655
8	17.0731	17.4596	15.4324	15.5130
16	17.2462	17.5954	15.5939	15.6575
24	17.4225	17.7378	15.7523	15.8040
32	17.6001	17.8790	15.9275	15.9494
40	17.7692	18.0179	16.1030	16.0971
48	17.9514	18.1577	16.2774	16.2326
56	18.1258	18.2934	16.4519	16.3880
64	18.3144	18.4605	16.6821	16.5371
72	18.4659	18.6016	16.8566	16.6788
Diferența de greutate, g	1.5446	1.2677	1.5754	1.3133
Coeficient de determinare (R^2)	0.9997	0.9995	0.9978	0.9999

Se observă că valoarea lui R^2 este peste 0.9978 ceea ce indică precizia și corectitudinea măsurărilor efectuate. Mai jos, în Tabelul 14 prin raportare la suprafața de difuzie a vaporilor de apă de 0.002289 m^2 s-au calculat valorile WVTR.

Tabelul 14. Determinarea WVTR a filmelor din β -glucan/suc de merișoare.

	Proba			
	1	2	3	4
Panta (greutate/timp), $\text{g} \times \text{h}^{-1}$	0.021453	0.017607	0.021881	0.01824
Suprafața de difuzie, m^2	0.002289	0.002289	0.002289	0.002289
WVTR, $\text{g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$	9.3719	7.6918	9.5588	7.9685

Rezultatele permeabilității la vaporii de apă exprimate în Tabelul 15 indică valori cuprinse între 0.3523 și $0.3782 \text{ g} \times \text{mm} \times \text{kPa}^{-1} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$. Aceste valori sunt mai ridicate decât în cazul filmelor realizate din β -glucan și suc de afine însă prin comparație cu literatura de specialitate, Severo et al., (2021) după dezvoltarea de filme pe bază de extract de merișoare și chitosan, pentru proprietățile antibacteriene au obținut valori ale WVP între 3.71 și $4 (\times 10^{-12} \text{ mol m/m}^2\text{sPa})$. Știind că 1 mol de apă cântărește 18.01 g putem deduce că valorile găsite pentru WVP de către autori au fost cuprinse între 0.2405 și $0.2593 \text{ g} \times \text{mm} \times \text{kPa}^{-1} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$, apropiate de valorile noastre.

În urma testelor de dizolvare a filmelor în apă distilată s-a observat că după un timp de 10 minute de agitare, probele de film nu s-au dizolvat complet. Acest lucru a fost cel mai probabil determinat de conținutul prea ridicat al solidelor în soluția formatoare de film. Pentru dezvoltarea de ambalaje, aceste filme pot oferi o dizolvare a produsului ambalat prin dispersare în soluția orală însă vor rămâne particule de filme în dispersie.

Tabelul 15. Valorile WVP pentru filmele realizate.

	Proba			
	1	2	3	4
WVTR, $\text{g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$	9.3719	7.6918	9.5588	7.9685
Grosimea filmului, mm	0.0898	0.1112	0.0876	0.1128
Δp , kPa	2.3765	2.3765	2.3765	2.3765
WVP, $\text{g} \times \text{mm} \times \text{kPa}^{-1} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$	0.3541	0.3599	0.3523	0.3782

O scădere a cantității de suc de merișoare de la 43 g suc de merișoare la 20 g va avea ca efect și scăderea timpului de solubilizare al filmelor. Este posibil și ca gelifiantul (alginatul de sodiu) care a fost adăugat în cantitate de 1 g să fi avut o influență asupra legăturilor intermoleculare noi create astfel încât filmul să nu se poată dizolva complet.

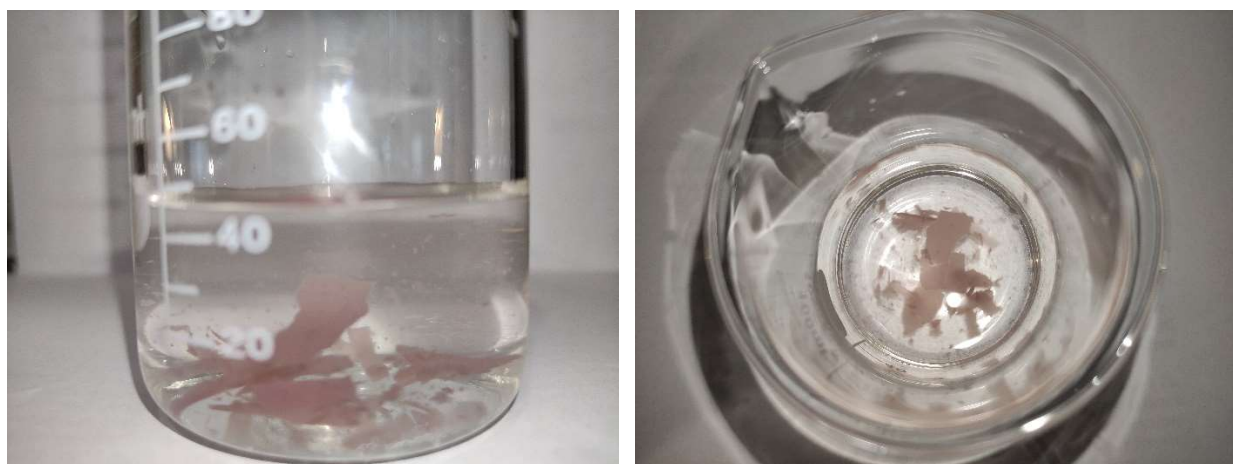


Figura 17. Imagini ale soluției cu particule în suspensie de β -glucan/suc de merișoare după testele de dizolvare.

Proprietățile optice ale filmelor obținute din β -glucan și suc de merișoare sunt prezentate în Figura 18. Se poate observa, de asemenea și aici cum pe domeniul ultraviolet (200-400 nm) filmul dezvoltat va conferi protecție împotriva radiațiilor UV (transmisia radiațiilor tinde către zero). Interesant este și trebuie menționat, datorită colorației intens roșii dată de pigmentii antocianici precum cianidinele și peonidinele din merișoare, în regiunea 500-600 nm se poate observa un peak descendent în transmisia radiației pe domeniul vizibil (săgeata marcată cu 1). Acest lucru ne indică faptul că filmele dezvoltate din β -glucan/suc de merișoare absorb într-o oarecare măsură radiația verde a spectrului vizibil.

În concluzie, filmele dezvoltate din β -glucan și suc de merișoare oferă potențial de ambalare al produselor pulverulente prin valori potrivite ale grosimii sub 200 μm și ale WVTR până la 9.5588 $\text{g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$. Datorită caracterului bioactiv al filmelor dezvoltate, acestea sunt adecvate în tratamentul și prevenția bolilor cronice. Dizolvarea filmelor nu a fost una satisfăcătoare pentru un film cu dizolvare rapidă însă produsele ambalate se pot dispersa prin dezintegrarea filmului în apă.

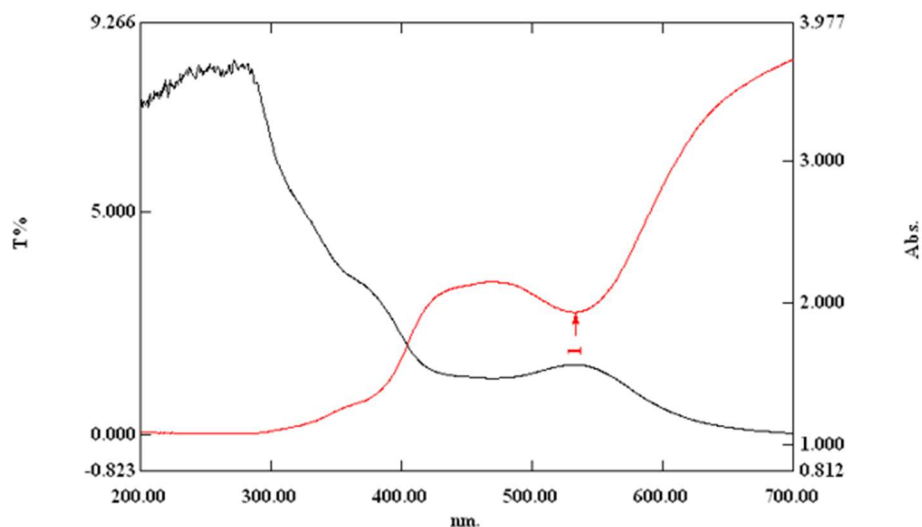


Figura 18. Spectrul de absorbție și transmisie prin proba de film 2 în domeniul 200-700 nm.

Capitolul VIII prezintă concluziile generale ale aceste teze și direcțiile de cercetare care pot fi abordate. Susținerea unei economii circulare prin valorificarea subproduselor și reducerea la minimum a deșeurilor reprezintă o strategie durabilă în protejarea mediului înconjurător. Prezenta teză de doctorat a urmărit într-o primă etapă ca în urma studiilor din literatura de specialitate și prin cercetările experimentale de laborator să se valorifice drojdia de bere reziduală cu obținerea de β -glucani. Sursa de extracție a β -glucanilor a fost drojdia de bere reziduală care de-a lungul proceselor fermentative de obținere a berii a înmagazinat ca substanță de rezervă glucoza sub formă de carbohidrați insolubili, cu potențial bioactiv. Având în vedere posibilitățile numeroase de extracție a β -glucanilor s-a luat în calcul utilizarea celor mai fiabile metode de extracție și combinarea acestora cu două tipuri de liză celulară. O purificare inițială a drojdiei reziduale este necesară pentru a nu influența procesele extractive și pentru a conferi produsului un grad alimentar. Fiecare metodă de extracție prezintă avantajele ei însă trebuie ținut cont de domeniul de utilizare a produsului finit, β -glucanii obținuți prin fragmentarea cu bile de sticlă nu mai păstrează forma nativă sferică a celulei.

Rezultatele cercetărilor experimentale de extracție și optimizare a parametrilor în vederea obținerii de β -glucani au stabilit un optim al concentrației celulare de 5% pentru drojdia lizată cu ajutorul bilelor de sticlă cu un raport de drojdie/bile de sticlă 1:2 și un număr de cicluri de vortexare de 3 a câte 10 minute fiecare; un optim al concentrației celulare de 15% la 55 °C timp de 24 ore pentru autoliza indusă a suspensiei de drojdie. Studiul comparativ privind metodele de extracție au indicat că cel mai ridicat randament al extracției de 11.96% al compușilor glucanici este întâlnit la extracția alcalină a celulelor de drojdie autolizate cu NaOH 1 N. Cu toate acestea, spectroscopia FT-IR a indicat două benzi caracteristice pentru α -glucani, ceea ce demonstrează o purificare insuficientă (puritatea β -glucanilor a fost de 55.39 %). Utilizarea unui tratament cu acid după extracția alcalină îmbunătățește puritatea până la 79.55 % pentru celulele autolizate. Un amestec de 1.5 N NaOH și 1 N HCl s-a dovedit a fi optim pentru o puritate ridicată, chiar dacă randamentul de extracție a scăzut la 7.79 %. Toate probele au fost purificate prin spălări succesive cu apă distilată, centrifugare și dializă (cu membrane de limitare a greutatea moleculară la 12 kDa) timp de 48 ore cu schimbarea regulată a apei. Micrografiile SEM au demonstrat că forma structurilor stratificate și a suprafețelor poroase a fost comparabilă cu morfologia β -glucanului obținut prin metode similare din drojdia de bere uzată.

Teza nu s-a limitat doar la valorificarea unui subprodus ci a continuat să ofere o direcție clară de utilizare a compușilor glucanici obținuți. În acest sens, cunoscându-se proprietățile bioactive de stimulare a imunității, descrise pe larg în partea introductivă, s-a procedat la dezvoltarea de filme bioactive cu principal rol de adjuvant în bolile metabolice cum este și cazul diabetului. Diverse sucuri naturale precum cel de rodie, afine ori merișoare, recunoscute pentru efectele antidiabetice au fost alese în compoziția soluțiilor formatoare de film.

Pentru filmele realizate din β -glucan/suc de rodie, în urma unui proces de optimizare s-a demonstrat că cea mai bună compoziție în raport cu răspunsurile, este: 1 g β -glucan, 0.6 g alginat de sodiu, 14 mL suc de rodie, 0.83 g glicerină și apă distilată până la 150 mL. Un minim al vitezei de transport al vaporilor de apă prin film (WVTR) de $27.1224 \text{ g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$, al permeabilității vaporilor de apă (WVP) de $1.390 \text{ g} \times \text{mm} \times \text{kPa}^{-1} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$, o grosime de 121.4 μm , o activitate a apei de 0.2287, un timp de solubilizare de 4.53 minute și o umiditate de 14.59% au fost obținute după analiza filmului optim. Transmisia radiației ultraviolete în domeniul 200-400 nm prin filmele realizate din 1 g β -glucan, 0.6 g alginat de sodiu și 14 mL suc de rodie a fost zero așadar filmul devine eficient și pentru ambalarea suplimentelor care sunt sensibile în prezența radiațiilor UV și necesită protecție.

Pentru filmele realizate din β -glucan/suc de afine s-a reușit dezvoltarea unui film cu dizolvare rapidă sub un minut cu utilizarea unui surfactant (ulei de soia) care a redus la jumătate timpul de solubilizare. Filmul cu cele mai bune proprietăți de dizolvare, ținând cont de un conținut crescut de 20 g de suc de afine și 1.5 g de β -glucan a fost reprezentat de proba care se dizolvă în 50.33 secunde. De asemenea, putem concluziona că la toate probele proprietățile de barieră la vaporii de apă sunt remarcabil scăzute. Valorile WVTR ale probelor noastre au prezentat un minim de $3.2562 \text{ g} \times \text{h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$.

Evaluarea microbiologică cu ajutorul mediilor de cultură specifice pentru fiecare agent patogen, pe lângă valorile activității apei, au demonstrat siguranța în consum a acestor membrane. Microscopia SEM pe suprafața plană a filmelor a reliefat o structură continuă, fără pori, microfisuri ori puncte de perforație prin care să se piardă produsele ambalate sub formă pulverulentă. Pe secțiunea transversală a filmului s-au identificat straturi longitudinale asociate uscării precum și unele discontinuități care sunt cel mai probabil asociate tăierii, iar prezența plastifiantului în compoziția acestuia nu va permite inițierea acestor microfisuri longitudinale. S-a adus de asemenea o îmbunătățire la filmele existente la ora actuală ce sunt alcătuite numai din β -glucan și glicerină și care după un an au devenit sensibile pe suprafață.

Pentru filmele din β -glucan/suc de merișoare, pentru un WVTR scăzut, compoziția optimă este 1 g β -glucan, 1 g alginat de sodiu, 43.79 g suc de merișoare, 1.25 g glicerină, 0.1 g ulei de soia și apă distilată până la 150 mL. S-a observat că solubilizarea nu a fost una completă semn că o cantitate a substanței solide de 5 g în 150 mL apă distilată este prea mare încât să permită dizolvarea totală a filmului însă, conținutul bioactiv oferă potențial de ambalare al produselor pulverulente.

Cercetările de obținere a β -glucanilor pot fi extinse și asupra altor tipuri de drojdii reziduale precum drojdia din vinificație; dezvoltarea de filme este una într-o continuă expansiune astfel încât, atât timp cât există o compatibilitate între polimeri pot fi realizate noi filme biologice active.

Bibliografie selectivă

- Abdalrazeq, M., Giosafatto, C. V. L., Esposito, M., Fenderico, M., Di Pierro, P., & Porta, R. (2019). Glycerol-plasticized films obtained from whey proteins denatured at alkaline pH. *Coatings*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/coatings9050322>
- Abdel Naser A. Zohri, H. M. (2019). Biotechnological β -glucan Production from Returned Baker's Yeast and Yeast Remaining after Ethanol Fermentation. *Egyptian Sugar Journal*, 13(November), 29–43.
- Aguilar-Uscanga, B., & François, J. M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*, 37(3), 268–274. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x>
- Aimanianda, V., Clavaud, C., Simenel, C., Fontaine, T., Delepierre, M., & Latgé, J. P. (2009). Cell wall β -(1,6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: Structural characterization and in situ synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13401–13412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807667200>
- Aimanianda, V., Simenel, C., Garnaud, C., & Clavaud, C. (2017). *crossm The Dual Activity Responsible for the Glucan in the Fungal Cell Wall*. July. <https://doi.org/10.1128/mBio.00619-17>
- Aimanianda V. (2017). Transglycosidases and Fungal Cell Wall β -(1,3)- Glucan Branching. *Mol Biol* 6: 194. Doi: 10.4172/2168-9547.1000194.
- Alizadeh-Sani, M., Tavassoli, M., McClements, D. J., & Hamishehkar, H. (2021). Multifunctional halochromic packaging materials: Saffron petal anthocyanin loaded-chitosan nanofiber/methyl cellulose matrices. *Food Hydrocolloids*, 111, 106237.
- Apostu, P. M., Mihociu, T. E., & Nicolau, A. I. (2017). Technological and sensorial role of yeast β -glucan in meat batter reformulations. *Journal of Food Science and Technology*, 54(9), 2653–2660. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2696-3>
- Arham, R., Mulyati, M. T., Metusalach, M., & Salengke, S. (2016). Physical and mechanical properties of agar based edible film with glycerol plasticizer. *International Food Research Journal*, 23(4), 1669–1675. <https://doi.org/10.31227/osf.io/tq2pf>
- Arora, K., Tomar, P. C., & Mohan, V. (2021). Diabetic neuropathy: an insight on the transition from synthetic drugs to herbal therapies. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 20(2), 1773–1784. <https://doi.org/10.1007/s40200-021-00830-2>
- Arroyo, J., Farkaš, V., Sanz, A. B., & Cabib, E. (2016). 'Strengthening the fungal cell wall through chitin–glucan cross-links: effects on morphogenesis and cell integrity.' *Cellular Microbiology*, 18(9), 1239–1250. <https://doi.org/10.1111/cmi.12615>
- Arya, A., Chandra, A., Sharma, V., & Pathak, K. (2010). Fast dissolving oral films: An innovative drug delivery system and dosage form. *International Journal of ChemTech Research*, 2(1), 576–583.
- Avramia, I., & Amariei, S. (2021). Spent Brewer's yeast as a source of insoluble β -glucans. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 825.
- Bacic, A., Fincher, G. B., & Stone, B. A. (2009). *Chemistry, biochemistry, and biology of 1-3 beta glucans and related polysaccharides*. Academic Press.
- Backhaus, K., Heilmann, C. J., Sorgo, A. G., Purschke, G., de Koster, C. G., Klis, F. M., & Heinisch, J. J. (2010). A systematic study of the cell wall composition of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 27(8), 647–660.
- Bacon, J. S., Farmer, V. C., Jones, D., & Taylor, I. F. (1969). The glucan components of the cell

- wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultrastructure. *The Biochemical Journal*, 114(3), 557–567. <https://doi.org/10.1042/bj1140557>
- Beuchat, L. R. (1983). *Influence of Water Activity on Growth, Metabolic Activities and Survival of Yeasts and Molds*. 46(2).
- Brennan, C. S., & Cleary, L. J. (2005). The potential use of cereal (1→3,1→4)-β-d-glucans as functional food ingredients. *Journal of Cereal Science*, 42(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.01.002>
- Brown, G. D. (2010). How Fungi Have Shaped Our Understanding of Mammalian Immunology. *Cell Host and Microbe*, 7(1), 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.12.005>
- Cao, Y., Sun, Y., Zou, S., Li, M., & Xu, X. (2017). Orally administered baker's yeast β-glucan promotes glucose and lipid homeostasis in the livers of obesity and diabetes model mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(44), 9665–9674.
- Chang, J., Li, W., Liu, Q., Zhou, Y., Chen, X., Lyu, Q., & Liu, G. (2019a). Preparation, properties, and structural characterization of β-glucan/pullulan blend films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 1269–1276. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.208>
- Chang, J., Li, W., Liu, Q., Zhou, Y., Chen, X., Lyu, Q., & Liu, G. (2019b). *Preparation, properties, and structural characterization of β-glucan/pullulan blend films*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.208>
- Chehri, A., Yarani, R., Yousefi, Z., Shakouri, S. K., Ostadrahimi, A., Mobasseri, M., & Araj-Khodaie, M. (2022). Phytochemical and pharmacological anti-diabetic properties of bilberries (*Vaccinium myrtillus*), recommendations for future studies. *Primary Care Diabetes*.
- Cilurzo, F., Cupone, I. E., Minghetti, P., Selmin, F., & Montanari, L. (2008). Fast dissolving films made of maltodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(3), 895–900.
- da Silva Guedes, J., Pimentel, T. C., Diniz-Silva, H. T., Tayse da Cruz Almeida, E., Tavares, J. F., Leite de Souza, E., Garcia, E. F., & Magnani, M. (2019). Protective effects of β-glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. *Lwt*, 116(August), 108496. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108496>
- Dahmash, E. Z., Iyire, A., & Alyami, H. S. (2021). Development of orally dissolving films for pediatric-centric administration of anti-epileptic drug topiramate – A design of experiments (DoE) study. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 29(7), 635–647. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.04.025>
- Dordevic, S., Dordevic, D., Sedlacek, P., Kalina, M., Tesikova, K., Antonic, B., Tremlova, B., Treml, J., Nejezchlebova, M., Vapenka, L., Rajchl, A., & Bulakova, M. (2021). Incorporation of natural blueberry, red grapes and parsley extract by-products into the production of chitosan edible films. *Polymers*, 13(19). <https://doi.org/10.3390/polym13193388>
- Feldman, E. L., Callaghan, B. C., Pop-Busui, R., Zochodne, D. W., Wright, D. E., Bennett, D. L., Bril, V., Russell, J. W., & Viswanathan, V. (2019). Diabetic neuropathy. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 1–18.
- Ferreira, C. S., Vendramini, T. H. A., Amaral, A. R., Rentas, M. F., Ernandes, M. C., da Silva, F. L., Oba, P. M., de Oliveira Roberti Filho, F., & Brunetto, M. A. (2022). Metabolic variables of obese dogs with insulin resistance supplemented with yeast beta-glucan. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 1–10.
- Ferreira, I. C., Araújo, D., Voisin, P., Alves, V. D., Rosatella, A. A., Afonso, C. A. M., Freitas, F., & Neves, L. A. (2020). Chitin-glucan complex – Based biopolymeric structures using biocompatible ionic liquids. *Carbohydrate Polymers*, 247(June), 116679.

- <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116679>
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Vieira, E., & Tavaréla, J. G. (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science and Technology*, 21(2), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.008>
- Ferreira, S. S., Passos, C. P., Madureira, P., Vilanova, M., & Coimbra, M. A. (2015). Structure – function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 132, 378–396. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.079>
- Francois, J. M., Formosa, C., Schiavone, M., Pillet, F., Martin-Yken, H., & Dague, E. (2013). Use of atomic force microscopy (AFM) to explore cell wall properties and response to stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 59(4), 187–196. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0411-0>
- Galichet, A., Sockalingum, G. D., Belarbi, A., & Manfait, M. (2001). FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: Study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. *FEMS Microbiology Letters*, 197(2), 179–186. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00101-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00101-X)
- Ha, C. H., Yun, C. W., Paik, H. D., Kim, S. W., Kang, C. W., Hwang, H. J., & Chang, H. I. (2006). Preparation and analysis of yeast cell wall mannoproteins, immune enhancing materials, from cell wall mutant *Saccharomyces cerevisiae*. In *Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 16, Issue 2, pp. 247–255).
- Happy International Beer Day! - Product - Eurostat. (n.d.). Retrieved August 20, 2020, from <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/EDN-20190802-1>
- Heiss, C., Istas, G., Feliciano, R. P., Weber, T., Wang, B., Favari, C., Mena, P., Del Rio, D., & Rodriguez-Mateos, A. (2022). Daily consumption of cranberry improves endothelial function in healthy adults: a double blind randomized controlled trial. *Food & Function*, 13(7), 3812–3824.
- Huang, W., Yao, L., He, X., Wang, L., Li, M., Yang, Y., & Wan, C. (2018). Hypoglycemic activity and constituents analysis of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit extracts. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 11, 357–366. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S166728>
- Jacob, F. F., Striegel, L., Rychlik, M., Hutzler, M., & Methner, F. J. (2019). Spent yeast from brewing processes: A biodiverse starting material for yeast extract production. *Fermentation*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation5020051>
- Jaehrig, S. C., Rohn, S., Kroh, L. W., Wildenauer, F. X., Lisdat, F., Fleischer, L. G., & Kurz, T. (2008). Antioxidative activity of (1→3), (1→6)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. *LWT - Food Science and Technology*, 41(5), 868–877. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.06.004>
- Kanjan, P., Sahasrabudhe, N. M., de Haan, B. J., & de Vos, P. (2017). Immune effects of β -glucan are determined by combined effects on Dectin-1, TLR2, 4 and 5. *Journal of Functional Foods*, 37, 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.061>
- Kanmani, P., & Rhim, J. W. (2014). Antimicrobial and physical-mechanical properties of agar-based films incorporated with grapefruit seed extract. *Carbohydrate Polymers*, 102(1), 708–716. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.099>
- Karumuthil-Melethil, S., Gudi, R., Johnson, B. M., Perez, N., & Vasu, C. (2014). Fungal β -glucan, a Dectin-1 ligand, promotes protection from type 1 diabetes by inducing regulatory innate immune response. *The Journal of Immunology*, 193(7), 3308–3321.
- Kasahara, S., Yamada, H., Mio, T., Shiratori, Y., Miyamoto, C., Yabe, T., Nakajima, T., Ichishima, E., & Furuichi, Y. (1994). Cloning of the *Saccharomyces cerevisiae* gene whose

- overexpression overcomes the effects of HM-1 killer toxin, which inhibits β -glucan synthesis. *Journal of Bacteriology*, 176(5), 1488–1499. <https://doi.org/10.1128/jb.176.5.1488-1499.1994>
- Khan, A. A., Gani, A., Masoodi, F. A., Amin, F., Wani, I. A., Khanday, F. A., & Gani, A. (2016). Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of β -d-glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)—Effect of γ -irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 140, 442–450.
- Klis, F. M., Boorsma, A., & Groot, P. W. J. De. (2006). *Cell wall construction in Saccharomyces cerevisiae*. 185–202. <https://doi.org/10.1002/yea.1349>
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 239–256. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(02\)00087-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(02)00087-6)
- Kogan, G., Alföldi, J., & Masler, L. (1988). ^{13}C -nmr spectroscopic investigation of two yeast cell wall β -D-glucans. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 27(7), 1055–1063.
- Kollár, R., Reinhold, B. B., Petráková, E., Yeh, H. J. C., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M., & Cabib, E. (1997). Architecture of the Yeast Cell Wall. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17762–17775. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17762>
- Kroner, Z. (2009). The Relationship between Alzheimer's Disease and Diabetes: Type 3 Diabetes. *Alternative Medicine Review*, 14(4).
- Laaksonen, O., Sandell, M., & Kallio, H. (2010). Chemical factors contributing to orosensory profiles of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) fractions. *European Food Research and Technology*, 231(2), 271–285. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1278-7>
- Lawrence, R. D. (1951). Types of human diabetes. *British Medical Journal*, 1(4703), 373.
- Lesage, G., & Bussey, H. (2006). Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 317–343. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00038-05>
- Levin, D. E. (2005). *Cell Wall Integrity Signaling in Saccharomyces cerevisiae*. 69(2), 262–291. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.262>
- Li, X.-E., Wang, J.-J., Phornsanthia, S., Yin, X., & Li, Q. (2014). Strengthening of Cell Wall Structure Enhances Stress Resistance and Fermentation Performance in Lager Yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 72(2), 88–94. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2014-0320-01>
- Liepins, J., Kovačova, E., Shvirksts, K., Grube, M., Rapoport, A., & Kogan, G. (2015). Drying enhances immunoactivity of spent brewer's yeast cell wall β -d-glucans. *Journal of Biotechnology*, 206, 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.03.024>
- Lim, L. I., Tan, H. L., & Pui, L. P. (2021). Development and characterization of alginate-based edible film incorporated with hawthorn berry (*Crataegus pinnatifida*) extract. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(3), 2540–2548.
- Liu, D., Ding, L., Sun, J., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2016). Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds — A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 36, 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.017>
- Liu, H., Bai, W., He, L., Li, X., Shah, F., & Wang, Q. (2020). Degradation mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* β -D-glucan by ionic liquid and dynamic high pressure microfluidization. *Carbohydrate Polymers*, 241(March), 116123. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116123>
- Lodolo, E. J., Kock, J. L. F., Axcell, B. C., & Brooks, M. (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1018–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00433.x>

- Ma, J., Lin, Y., Chen, X., Zhao, B., & Zhang, J. (2014). Flow behavior, thixotropy and dynamical viscoelasticity of sodium alginate aqueous solutions. *Food Hydrocolloids*, 38, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.016>
- Majumdar, A., Pradhan, N., Sadasivan, J., Acharya, A., Ojha, N., Babu, S., & Bose, S. (2018). Food degradation and foodborne diseases: a microbial approach. In *Microbial contamination and food degradation* (pp. 109–148). Elsevier.
- Mallakpour, S., Azadi, E., & Hussain, C. M. (2021). Chitosan, alginate, hyaluronic acid, gums, and β -glucan as potent adjuvants and vaccine delivery systems for viral threats including SARS-CoV-2: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 1931–1940. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.155>
- Mancini, M., Moresi, M., & Sappino, F. (1996). Rheological behaviour of aqueous dispersions of algal sodium alginates. *Journal of Food Engineering*, 28(3–4), 283–295.
- Marson, G. V., de Castro, R. J. S., Belleville, M. P., & Hubinger, M. D. (2020). Spent brewer's yeast as a source of high added value molecules: a systematic review on its characteristics, processing and potential applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(7), 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02866-7>
- Mbara, K. C., Rambharose, S., Baijnath, H., Nlooto, M., & Owira, P. M. O. (2022). Antidiabetic effects of Psidium x durbanensis Baijnath & Ramcharun ined.(Myrtaceae) leaf extract on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 115542.
- McIntyre, H. D., Catalano, P., Zhang, C., Desoye, G., Mathiesen, E. R., & Damm, P. (2019). Gestational diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 1–19.
- Mellitus, D. (2005). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 28(S37), S5–S10.
- Neves, D., Andrade, P. B., Videira, R. A., de Freitas, V., & Cruz, L. (2022). Berry anthocyanin-based films in smart food packaging: A mini-review. *Food Hydrocolloids*, 107885.
- NORTHCOTE, D. H., & HORNE, R. W. (1952). The chemical composition and structure of the yeast cell wall. *The Biochemical Journal*, 51(2), 232–236. <https://doi.org/10.1042/bj0510232>
- Novák, M., Synytsyaa, A., Gedeonb, O., Slepíčkac, P., Procházkab, V., Synytsyad, A., Blahovece, J., Hejlováe, A., & Čopíkováa, J. (2012). Yeast $\beta(1-3),(1-6)$ -d-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2496–2504. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.031>
- Onofre, S. B., Bertoldo, I. C., Abatti, D., & Refosco, D. (2017). Chemical Composition of the Biomass of *Saccharomyces cerevisiae* - (Meyen ex E. C. Hansen, 1883) Yeast obtained from the Beer Manufacturing Process. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2(2), 558–562. <https://doi.org/10.22161/ijeab/2.2.2>
- Patchen, M. L., & MacVittie, T. J. (1985). Stimulated hemopoiesis and enhanced survival following glucan treatment in sublethally and lethally irradiated mice. *International Journal of Immunopharmacology*, 7(6), 923–932. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(85\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0192-0561(85)90056-6)
- Peltzer, M. A., Salvay, A. G., Delgado, J. F., de la Osa, O., & Wagner, J. R. (2018). Use of Residual Yeast Cell Wall for New Biobased Materials Production: Effect of Plasticization on Film Properties. *Food and Bioprocess Technology*, 11(11), 1995–2007. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2156-8>
- Peltzer, M., Delgado, J. F., Salvay, A. G., & Wagner, J. R. (2018). β -Glucan, a Promising Polysaccharide for Bio-based Films Developments for Food Contact Materials and Medical Applications. *Current Organic Chemistry*, 22(12), 1249–1254. <https://doi.org/10.2174/1385272822666171129153633>
- Pengkumsri, N., Sivamaruthi, B. S., Sirilun, S., Peerajan, S., Kesika, P., Chaiyasut, K., &

- Chaiyasut, C. (2017). Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in Vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. *Food Science and Technology*, 37(1), 124–130. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.10716>
- Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I. H., Wurz, L., & Todd, E. W. (1956). The properdin system and immunity: III. The zymosan assay of properdin. *The Journal of Experimental Medicine*, 103(1), 1.
- Pinto, M., Coelho, E., Nunes, A., Brandão, T., & Coimbra, M. A. (2015). Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: A structural characterization approach. *Carbohydrate Polymers*, 116, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.010>
- Powell, C. D., & Diacetis, A. N. (2007). Long term serial repitching and the genetic and phenotypic stability of brewer's yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 113(1), 67–74. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2007.tb00258.x>
- Rahmawati, H., Mutmainna, I., Ilyas, S., Fahri, A. N., Wahyuni, A. S. H., Afrianti, E., Setiawan, I., & Tahir, D. (2020). Effect of carbon for enhancing degradation and mechanical properties of bioplastics composite cassava starch/glycerin/carbon. *AIP Conference Proceedings*, 2219(1), 100004.
- Raikos, V., Grant, S. B., Hayes, H., & Ranawana, V. (2018). Use of β -glucan from spent brewer's yeast as a thickener in skimmed yogurt: Physicochemical, textural, and structural properties related to sensory perception. *Journal of Dairy Science*, 101(7), 5821–5831. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14261>
- Reesha, K. V., Satyen Kumar, P., Bindu, J., & Varghese, T. O. (2015). Development and characterization of an LDPE/chitosan composite antimicrobial film for chilled fish storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 934–942. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.016>
- Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M., & Wiebe, M. G. (2017). Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001-2016. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>
- Rocha, D. M. U. P., Caldas, A. P. S., da Silva, B. P., Hermsdorff, H. H. M., & Alfenas, R. de C. G. (2019). Effects of blueberry and cranberry consumption on type 2 diabetes glycemic control: A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(11), 1816–1828.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., & Maté, J. I. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39(8), 840–846. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.04.002>
- Roland, C. M. (2013). *Chapter 6 - Rheological Behavior and Processing of Unvulcanized Rubber* (J. E. Mark, B. Erman, & C. M. B. T.-T. S. and T. of R. (Fourth E. Roland (Eds.); pp. 285–336). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394584-6.00006-6>
- Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., & Ogurtsova, K. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 157, 107843.
- San Martin, D., Orive, M., Iñarra, B., Castelo, J., Estévez, A., Nazzaro, J., Iloro, I., Elortza, F., & Zufia, J. (2020). Brewers' Spent Yeast and Grain Protein Hydrolysates as Second-Generation Feedstuff for Aquaculture Feed. *Waste and Biomass Valorization*, 3–6. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01145-8>
- Sanz, A. B., García, R., Rodríguez-Peña, J. M., & Arroyo, J. (2018). The CWI pathway: Regulation

- of the transcriptional adaptive response to cell wall stress in yeast. *Journal of Fungi*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/jof4010001>
- Severo, C., Anjos, I., Souza, V. G. L., Canejo, J. P., Bronze, M. R., Fernando, A. L., Coelho, I., Bettencourt, A. F., & Ribeiro, I. A. C. (2021). Development of cranberry extract films for the enhancement of food packaging antimicrobial properties. *Food Packaging and Shelf Life*, 28(September 2020). <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100646>
- Solecki, M., Trawińska, A., & Kacprowicz, A. (2021). The effect of cell size on the kinetics of yeast disintegration in a bead mill. *Powder Technology*, 380, 584–597. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.10.091>
- Suwannarong, S., Wongsagonsup, R., & Supphantharika, M. (2020). Effect of spent brewer's yeast β -D-glucan on properties of wheat flour dough and bread during chilled storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 381–393. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.001>
- Synytysya, A., & Novák, M. (2013). Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 792–809. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.077>
- Tanguler, H., & Erten, H. (2008). Utilisation of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: The effect of temperature. *Food and Bioprocess Processing*, 86(4), 317–321. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2007.10.015>
- Tartar, A., Shapiro, A. M., Scharf, D. W., & Boucias, D. G. (2005). Differential expression of chitin synthase (CHS) and glucan synthase (FKS) genes correlates with the formation of a modified, thinner cell wall in in vivo-produced *Beauveria bassiana* cells. *Mycopathologia*, 160(4), 303–314. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0134-y>
- Thiago, R. dos S. M., Pedro, P. M. de M., & Eliana, F. C. S. (2014). Solid wastes in brewing process: A review. *Journal of Brewing and Distilling*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.5897/JBD2014.0043>
- Tian, X., Yang, P., & Jiang, W. (2019). Effect of Alkali Treatment Combined with High Pressure on Extraction Efficiency of β -d-Glucan from Spent Brewer's Yeast. *Waste and Biomass Valorization*, 10(5), 1131–1140. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0130-8>
- Vetvicka, V. (2020). β - glucan as a new tool in vaccine development. *September 2019*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/sji.12833>
- Vilkickyte, G., Petrikaite, V., Pukalskas, A., Sipailiene, A., & Raudone, L. (2022). Exploring *Vaccinium vitis-idaea* L. as a potential source of therapeutic agents: antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of extracts and fractions. *Journal of Ethnopharmacology*, 292(January), 115207. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115207>
- Wang, J., Li, M., Zheng, F., Niu, C., Liu, C., Li, Q., & Sun, J. (2018). Cell wall polysaccharides: before and after autolysis of brewer's yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2508-6>
- Worrasinchai, S., Supphantharika, M., Pinjai, S., & Jamnong, P. (2006). β -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocolloids*, 20(1), 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.03.005>
- Wu, W., Solval, K. M., & Chen, J. (2022). Inhibitory activity of aqueous extracts of pomegranate peel products and juice powder against *Salmonella enterica*. *LWT*, 155, 112934.
- Xu, Q., Nakajima, M., Liu, Z., & Shiina, T. (2011). Soybean-based surfactants and their applications. *Soybean-Applications and Technology*, 341–364.
- Zechnner-Krpan, V., Petravić-Tominac, V., Gospodarić, I., Sajli, L., Daković, S., & Filipović-Grčić, J. (2010). Characterization of β -glucans isolated from brewer's yeast and dried by different methods. *Food Technology and Biotechnology*, 48(2), 189–197.

- Zhang, H., Colclough, K., Gloyn, A. L., & Pollin, T. I. (2021). Monogenic diabetes: a gateway to precision medicine in diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(3).
- Zhao, Y., Du, J., Zhou, H., Zhou, S., Lv, Y., Cheng, Y., Tao, Y., Lu, J., & Wang, H. (2022). Biodegradable intelligent film for food preservation and real-time visual detection of food freshness. *Food Hydrocolloids*, 129(December 2021), 107665. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107665>

LISTA DE LUCRĂRI

A. Articole / studii publicate în reviste de specialitate indexate ISI – Web of Science (WoS):

Avramia, I., & Amariei, S. (2022). Formulation of Fast Dissolving β -Glucan/Bilberry Juice Films for Packaging Dry Powdered Pharmaceuticals for Diabetes. *Plants*, 11(15), 2040, <https://doi.org/10.3390/plants11152040>, (**Factor de Impact– 4.658**), **Q1**

Avramia, I., & Amariei, S. (2022). Formulation, Characterization and Optimization of β -Glucan and Pomegranate Juice Based Films for Its Potential in Diabetes. *Nutrients*, 14(10), 2142., <https://doi.org/10.3390/nu14102142>, (**Factor de Impact– 6.706**), **Q1**

Avramia, I., & Amariei, S. (2022). A Simple and Efficient Mechanical Cell Disruption Method Using Glass Beads to Extract β -Glucans from Spent Brewer's Yeast. *Applied Sciences*, 12(2), 648, <https://doi.org/10.3390/app12020648>, (**Factor de Impact – 2.838**), **Q2**

Avramia, I., & Amariei, S. (2021). Spent Brewer's Yeast as a Source of Insoluble β -Glucans. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 825., <https://doi.org/10.3390/ijms22020825>, (**Factor de Impact – 6.208**), **Q1**

B. Articole / studii publicate în reviste de specialitate indexate ISI– Proceedings:

Avramia, I., & Amariei, S. (2021). PURIFICATION OF SPENT BREWER'S YEAST FOR OBTAINING BETA GLUCANS: A FACTOR IN THE VALORIZATION OF BY-PRODUCTS AND WASTE REDUCTION. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*, 21(4.1), 155-163., <https://doi.org/10.5593/sgem2021/4.1/s18.30>

C. Articole / studii publicate în reviste de specialitate în reviste de specialitate recunoscute în baze de date internaționale (BDI):

Avramia, I., Amariei, S., & Ursachi, F. V. (2021). Bioactive β^2 -Glucans, Adjuvants in SARS-CoV-2 Antiviral Therapy. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 33(4), 25977-25980., DOI: 10.26717/BJSTR.2021.33.005431

D. Studii prezentate la manifestări științifice naționale și internaționale:

Avramia, I., (2022), Development of fast dissolving bioactive films with β -glucan from spent brewer's yeast and bilberry juice, The 17th International Conference of Constructive Design and Technological Optimization in Machine Building Field, "VASILE ALECSANDRI" UNIVERSITY OF BACAU, ROMANIA, 25-27 Mai, Secțiunea F. Chemical & Food Engineering.

Avramia, I., (2022), Influence of Extraction Methods on β -glucans Yield and Purity from Spent Brewer's Yeast, 88 International scientific conference of young scientist and students, National University of Food Technologies, Kiev, April-Mai, Secțiunea 12. Biotehnologii și bioinginerie.

Avramia, I., (2021), Purification of spent brewer's yeast for obtaining beta glucans: a factor in the valorization of by-products and waste reduction, XXIth International Multidisciplinary Scientific GeoConference Surveying, Geology and Mining, Ecology and Management – SGEM 2021, 22-27 August 2021, Albena, Bulgaria, Secțiunea: 18. Recycling, <https://www.sgem.org/index.php/peer-review-and-metrics/conference-proceedings-sgem>

Avramia, I., (2021), PRODUCTION OF BETA GLUCAN FROM SPENT BREWER'S YEAST, INTERNATIONAL CONFERENCE "CHIMIA" 2020, 27-29 Mai 2021, Constanța, ISSN 2360-3941.

Avramia, I., (2020), INFLUENCE OF CELL DISRUPTION ON β -GLUCAN EXTRACTION FROM SPENT BREWER'S YEAST, International Conference for Students "Student in Bucovina" 9 th Edition, 18 Decembrie 2020 Suceava, Romania, Student in Bucovina Abstracts, ISSN 2068-7648.

Avramia, I., (2019), Use of beta-glucan as a functional ingredient in food products, 85 International scientific conference of young scientist and students, National University of Food Technologies, 11-12 Aprilie, Secțiunea 1. Food and Chemical Technology

Avramia, I., (2018), RESEARCH ON OBTAINING β -GLUCAN FROM YEAST FOR ENHANCING THE BIOACTIVE POTENTIAL IN FOOD PRUDUCTS, International Conference for Students "Student in Bucovina" 8th Edition, 15 – 16 Noiembrie, Suceava, Romania, November 15-16th 2018, Student in Bucovina Abstracts, ISSN 2068-7648.