

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚELE VIETII
„REGELE MIHAI I” DIN TIMIȘOARA
Școala Doctorală INGINERIA RESURSELOR VEGETALE ȘI ANIMALE
Domeniul INGINERIA PRODUSELOR ALIMENTARE**

TEZĂ DE ABILITARE

**METABOLIȚI MICROBIENI UTILIZAȚI CA ADITIVI ÎN
INDUSTRIA ALIMENTARĂ**

REZUMAT

Conf. univ. dr. FERDEȘ MARIANA

Timișoara 2024

**UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES
„KING MIHAI I” FROM TIMIȘOARA
Doctoral School ENGINEERING OF PLANT AND ANIMAL RESOURCES
Field of FOOD ENGINEERING**

HABILITATION THESIS

**MICROBIAL METABOLITES USED AS ADDITIVES IN THE
FOOD INDUSTRY**

Associate Professor PhD FERDEȘ MARIANA

Timișoara 2024

Teza de abilitare este structurată pe două părți, după cum urmează: în prima parte (capitolul 1 și capitolul 2) sunt prezentate principalele realizări științifice, profesionale și academice începând cu anul 2001, după susținerea tezei de doctorat, și până în prezent. Partea a doua conține perspectivele de evoluție și dezvoltare a carierei științifice, profesionale și academice.

Domeniile de cercetare științifică se referă la ingineria produselor alimentare, cu o abordare complementară a microbiologiei și biotehnologiei aplicate în industria alimentară, în contextul economiei circulare și sustenabilității. Prin urmare, cercetările au avut un caracter multidisciplinar și au reflectat experiența acumulată în activitatea de cercetare în cadrul facultății Ingineria Sistemelor Biotehnice din Universitatea Națională de Științe și Tehnologie Politehnica București.

Capitolul 1 se referă la principalele realizări științifice, profesionale și academice ale autoarei și conține aspecte ale activității de cercetare și didactice din perioada 2001 și până în prezent.

În capitolul 2 din aceasta teză de abilitare sunt prezentate cele două direcții principale ale cercetărilor în domeniul aditivilor alimentari și anume: 1) obținerea și caracterizarea unor aditivi alimentari de culoare din pigmenți microbieni cu activitate antioxidantă și antimicrobiană și 2) obținerea biomasei miceliene din ciuperci medicinale și testarea, în viitor, în produsele de panificație.

Apariția pe piață a produselor din ce în ce mai elaborate, fabricate din materii prime fracționale, reconstituite, conținând constituenți de origine diversă, conferă un loc important aditivilor de culoare, iar utilizarea acestora a devenit un obicei curent în industria alimentară. Coloranții nu trebuie însă să servească la disimularea unei alterări sau pentru a determina consumatorul să se înșele cu privire la compoziția alimentului.

Presiunea puternică actuală a opiniei publice în legătură cu moda “all natural” se manifestă în mod cu totul deosebit asupra adaosului de coloranți în produsele alimentare. Acest fenomen i-a determinat pe fabricanți să înceapă să înlocuiască coloranții de sinteză pe care îi utilizau în mod tradițional cu coloranți de origine naturală sau natural-identici. În domeniul alimentar, cuvântul “natural” are o conotație pozitivă, adesea sinonimă cu inocuitatea.

Culoarea joacă un rol semnificativ în sectorul producției și procesării alimentelor, contribuind la proprietățile senzoriale ale acestora. Pentru un aliment, culoarea semnifică prospețime, valoare nutritivă, siguranță și valoare estetică, afectând direct valoarea de

piață a produsului alimentar colorat. Cercetarea coloranților naturali alimentari a devenit un domeniu cheie în industria alimentară, în special descoperirea de noi surse.

Culorile naturale sunt considerate sigure dacă sunt non-alergice, nontoxice, necancerigene și biodegradabile, fără a prezenta riscuri pentru mediu. În ultima perioadă există o cerere crescândă pentru noi surse de coloranți naturali și se estimează ca aceasta categorie de aditivi alimentari va crește cu 7% anual.

Culorile naturale sunt derivate în principal din plante, insecte, minerale sau surse microbiene. Coloranții microbieni sunt preferabili din cauza biosintezei facile, precum și a unui potențial cost de producție mai mic. Fermentația microbială pentru producerea pigmentilor naturali are mai multe beneficii, dintre care pot fi amintite o producție ieftină, randamente mai mari, extracție mai ușoară, materii prime cu costuri mai mici, fără variații sezoniere. Există de asemenea diferite tehnici de îmbunătățire a potențialului biosintetic al tulpinilor.

În plus, coloranții naturali pot avea numeroase beneficii pentru sănătate, cum ar fi activitatea anticanceră, activitatea antimicrobială și activitatea antioxidantă.

Bacteriile și fungii produc o varietate de pigmenți care pot fi utilizați drept coloranți alimentari: carotenoide, flavine, melanine, chinine, monascorubrina, violaceina și alții, care pot fi folosiți și ca aditivi, antioxidanți, intensificatori de culoare și ingrediente alimentare funcționale. Microorganismele produc cantități mari de compuși biologic și farmacologic activi, care pot avea o gamă diversă de proprietăți ca antioxidanți, antimicrobieni, anticancer, compuși imuno-reglatori și antiinflamatori.

Există în ultima perioadă un interes considerabil la nivel mondial pentru producerea de pigmenți din surse microbiene, deoarece producerea acestora este mai ieftină și avantajoasă fiind independentă de condițiile de mediu. Din acest motiv, cercetările prezentate în capitolul 2 se referă la „Metaboliți microbieni utilizați ca aditivi în industria alimentară”.

În cadrul proiectului “Contract de cercetare nr. 62-070 /2008 Conceperea și dezvoltarea unor biotehnologii inovative de obținere a nanopreparatelor din *Monascus* sp. cu aplicații potențiale în terapie – PN II CNMP”, am efectuat cercetări privind stabilirea condițiilor optime de biosinteză a pigmentilor din *Monascus* și obținerea orezului roșu fermentat, caracterizarea pigmentilor și studiul proprietăților antioxidante și antimicrobiene. Capitolul 2.2.1. descrie principalele rezultate obținute în cadrul acestui proiect de cercetare despre obținerea aditivului de culoare prin cultivarea unei tulpini de *Monascus purpureus* pe substrat de orez în sistem solid-state fermentation (SSF). Colorantul obținut a fost caracterizat din punct de vedere al activității antioxidante și antimicrobiene, al sensibilității la acțiunea factorilor de mediu și al toxicității sale.

În prezent, genul *Monascus* este utilizat pentru a produce un aditiv alimentar de culoare cu proprietăți terapeutice – antioxidante, antibacteriene, antifungice, anti-inflamatoare și dietetice.

Biosinteza pigmentilor din *Monascus* pe medii solide reprezintă cea mai eficientă și mai puțin costisitoare metodă, având în vedere că orezul roșu fermentat este cel mai adesea utilizat ca atare, fără a se efectua extracția acestora.

Pigmenții din *Monascus* au fost obținuți prin cultivarea tulpinii fungice pe un mediu conținând orez sterilizat, la 35 °C, timp de 10 zile

Extractul alcoolic din *Monascus* a prezentat o activitate antioxidantă de 80 Echivalenți TROLOX/mL, ceea ce demonstrează că acest produs poate fi utilizat ca agent antioxidant în unele produse alimentare și în ambalajele care vin în contact cu alimentul. Orezul roșu fermentat are o acțiune antimicrobiană semnificativă față de mai multe specii de bacterii și mușcari și, de aceea, poate funcționa ca aditiv de conservare pentru industria preparatelor din carne.

În capitolul 2.2.2. am abordat, împreună cu o echipă de cercetare din cadrul Institutului National de Cercetare-Dezvoltare Chimico-Farmaceutică București, obținerea de pigmenți carotenoidici din drojdia *Rhodotorula rubra*. În cadrul proiectului “Elaborarea biotehnologiilor avansate de preparare a produselor farmaceutice antioxidante cu torularhodina și studiul potențialelor aplicații terapeutice, CNMP-PNCD/61-021/2007”, am efectuat cercetări privind stabilirea mediului optim și a parametrilor de dezvoltare a acestei drojdii și a biosintezei torularhodinei în medii lichide, precum și extracția și caracterizarea acestui pigment.

Mediile de cultură utilizate au prezentat o influență considerabilă asupra dezvoltării biomasei celulare și biosintezei pigmentilor carotenoidici, în particular a torularhodinei.

Extracția pigmentilor a fost efectuată în n-hexan (pigmenți carotenoidici totali) și în metanol bazic (extracția torularhodinei, singura componentă cu caracter acid).

Pentru tulpina R1 s-a determinat cea mai mare producție de torularhodină în mediul MS3 cu fructoză (626 μg/l mediu), urmată de cultura în mediul cu zaharoză și glucoză.

Extractul în metanol conținând torularhodină a prezentat atât activitate antibacteriană față de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* și *Enterococcus faecalis* cât și activitate antifungică față de speciile *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum* și *Candida utilis*.

S-a determinat de asemenea o puternică activitate antioxidantă a extractului metanolic de torularhodină. Determinările ulterioare au demonstrat că această activitate scade în timp, probabil datorită proceselor de oxidare la nivelul legăturilor duble C=C.

Ultimul capitol al primei părți „Cultivarea unor specii de Bazidiomicete pentru obținerea de biomasă și lacază” în care mi-am propus să studiez posibilitatea cultivării ciupercilor din încrengatura Bazidiomycota pe cereale (grâu) și utilizarea culturii astfel obținute în industria alimentară, sub diferite forme. Aceste cercetări sunt și vor fi realizate în cadrul proiectului în derulare “Biosinteza și utilizarea miceliului de ciuperci obținut prin cultură submersă și de suprafață, Contract nr. 55/10.10.2023, GNAC ARUT 2023”. În paralel am urmărit și obținerea de enzime cu acțiune lacazică, ce pot fi utilizate pentru valorificarea diferitelor deșeuri și subproduse generate de industria agroalimentară.

Principalele ciuperci medicinale sunt caracterizate prin utilizarea lor istorică și acceptarea lor comercială și medicală curentă, ca de exemplu: *Ganoderma lucidum* (Reishi sau Ling Zhi), *Lentinus (Lentinula) edodes* (Shiitake), *Phellinus linteus*, *Porio cocos*, *Auricularia auricula*, *Hericium erinaceus*, *Grifola frondosa* (Maitake), *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus* (ciuperca stridie), *Trametes (Coriolus) versicolor*, *Tremella fuciformis*, *Schizophyllum commune* și *Cordyceps sinensis* (ciuperca omida).

Spre deosebire de cultivarea tradițională a ciupercilor comestibile, care necesită timp și spațiu de cultură mai mari și produce recolte variabile, cultivarea sub formă de miceliu (hife) este o metodă actuală, care reduce semnificativ timpul de creștere, contaminarea externă și produce o biomasă cu proprietăți nutriționale valoroase. În plus, unele ciuperci au calități terapeutice considerabile, datorate metaboliților bioactivi sintetizați intra și extracelular: au proprietăți antiinflamatoare, antioxidante, anticancerigene, hipocolesterolemice, antidiabetice, imunomodulatoare și altele.

Prin cultivarea fungilor din clasa Bazidiomicete se obțin substanțe funcționale din clasa polizaharidelor, proteine, trigliceride, compuși fenolici, terpenoide, steroli, nucleotide, lactone, acizi grași nesaturați etc.

Unii fungi pot sintetiza enzime din clasa oxido-reductaze (lacaza cu acțiune de degradare a ligninei) și hidrolaze (amilaze, celulaze, proteaze și altele), cu rol în descompunerea substraturilor organice. Aceste enzime pot fi recuperate din culturile lichide după separarea biomasei.

Cele mai răspândite deșeuri din industria alimentară care conțin materiale lignocelulozice sunt cele de origine vegetală. Principalele deșeuri de acest tip sunt generate de industria de procesare a fructelor și legumelor, morărit și panificație, industria extractivă, industria berii și vinificație.

Pentru obținerea de biomasă fungică și lacază, au fost utilizate 5 specii de ciuperci comestibile cultivate sub forma de miceliu și anume: *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina filiformis* (denumita comercial Enoki flower), *Ganoderma lucidum* (denumita și Reishi), *Lentinula edodes* (Shiitake) și *Polyporus squamosus*.

Ciupercile au fost cultivate pe medii de cultură specifice pentru evidențierea enzimelor cu activitate lacazică, amilazică, proteolitică, lipazică și celulozolică și pentru determinarea vitezelor medii de creștere.

Cultura în submers utilizând un mediu cu melasă din trestie de zahăr a demonstrat că după 3 zile de termostatare la 25 °C cu agitare la 150 rpm cea mai mare cantitate de biomasă a fost obținută utilizând speciile *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* și *Polyporus squamosus*.

Cea mai bună activitate enzimatică a lacazei s-a determinat în culturile de *Pleurotus ostreatus* și *Lentinula edodes*.

Prin cultivarea ciupercilor comestibile medicinale sub formă de miceliu în medii lichide poate fi obținută o biomasă fungică ușor de separat, care poate fi utilizată în industria alimentară ca supliment alimentar bogat în proteine, polizaharide, vitamine, săruri, fibre și care poate conține compuși cu activitate de îmbunătățire a producției sistemului imunitar.

Partea a doua a tezei se referă la principalele perspective de evoluție și dezvoltare a carierei științifice, profesionale și academice.

Principalele activități de cercetare pe care intenționez să le desfășor în continuare urmează direcțiile sintetizate în actuala teză de abilitare, care au fost doar parțial studiate și necesită o aprofundare mai detaliată în vederea obținerii unor rezultate noi, respectiv identificarea și dezvoltarea unor noi direcții de cercetare.

Teza de abilitare se încheie cu referințele bibliografice care cuprind atât reperele bibliografice generale, cât și publicațiile proprii care au stat la baza elaborării acesteia.

ABSTRACT

The habilitation thesis is structured in two parts, as follows: in the first part, (chapter 1 and chapter 2), the main scientific, professional and academic achievements are presented starting from 2001, after the doctoral thesis was defended, and until now. The second part contains the prospects for the evolution and development of the scientific, professional and academic career.

The fields of scientific research relate to food engineering, with a complementary approach to microbiology and applied biotechnology in the food industry, in the context of the circular economy and sustainability. Therefore, the research had a multidisciplinary character and reflected the experience accumulated in the research activity within the

Biotechnical Systems Engineering faculty of the National University of Science and Technology Politehnica Bucharest.

Chapter 1 refers to the main scientific, professional and academic achievements of the author and contains aspects of the research and teaching activity from 2001 until now.

In chapter 2 of this habilitation thesis, the two main directions of research in the field of food additives are presented, namely: 1) obtaining and characterizing color food additives from microbial pigments with antioxidant and antimicrobial activity and 2) obtaining mycelial biomass from medicinal mushrooms and future testing in bakery products.

The appearance on the market of increasingly elaborate products, made from fractional, reconstituted raw materials, containing constituents of diverse origin, gives an important place to color additives, and their use has become a current habit in the food industry. The colorings must not, however, serve to conceal an alteration or to cause the consumer to be mistaken about the composition of the food.

The current strong pressure of public opinion in relation to the "all natural" fashion manifests itself in a very special way with the addition of dyes in food products. This phenomenon has led manufacturers to start replacing the synthetic dyes they traditionally used with natural or nature-identical dyes. In the food field, the word "natural" has a positive connotation, often synonymous with harmlessness.

Color plays a significant role in the food production and processing sector, contributing to their sensory properties. For a food, color signifies freshness, nutritional value, safety and aesthetic value, directly affecting the market value of the colored food product. The research of natural food colors has become a key area in the food industry, especially the discovery of new sources.

Natural colors are considered safe if they are non-allergenic, non-toxic, non-carcinogenic and biodegradable, without posing risks to the environment. Recently there is a growing demand for new sources of natural colorants, and it is estimated that this category of food additives will grow by 7% annually.

Natural colors are mainly derived from plants, insects, minerals or microbial sources. Microbial dyes are preferable because of easy biosynthesis as well as a potential lower production cost. Microbial fermentation to produce natural pigments has several benefits, among which cheap production, higher yields, easier extraction, lower cost raw materials, no seasonal variations can be mentioned. There are also different techniques for improving the biosynthetic potential of strains.

In addition, natural dyes may have numerous health benefits, such as anticancer activity, antimicrobial activity, and antioxidant activity.

Bacteria and fungi produce a variety of pigments that can be used as food colorants: carotenoids, flavins, melanins, quinines, monascorubrin, violacein, and others, which can also be used as additives, antioxidants, color enhancers, and functional food ingredients. Microorganisms produce large amounts of biologically and pharmacologically active compounds, which can have a diverse range of properties such as antioxidants, antimicrobials, anticancer, immuno-regulatory and anti-inflammatory compounds.

There has recently been considerable worldwide interest in the production of pigments from microbial sources, as their production is cheaper and advantageous being independent of environmental conditions. For this reason, the research presented in Chapter 2 refers to "Microbial metabolites used as additives in the food industry".

Within the project "Research contract no. 62-070 /2008 Conception and development of innovative biotechnologies for obtaining nanopreparations from *Monascus* sp. with potential applications in therapy - PN II CNMP", we carried out research on establishing the optimal conditions for the biosynthesis of *Monascus* pigments and obtaining fermented red rice, the characterization of pigments and the study of antioxidant and antimicrobial properties. Chapter 2.2.1. describes the main results obtained in this research project on obtaining the color additive by cultivating a strain of *Monascus purpureus* on rice substrate in a solid-state fermentation (SSF) system. The dye obtained was characterized in terms of antioxidant and antimicrobial activity, sensitivity to the action of environmental factors and its toxicity.

Currently, the *Monascus* genus is used to produce a color food additive with therapeutic properties – antioxidant, antibacterial, antifungal, anti-inflammatory and dietary.

The biosynthesis of *Monascus* pigments on solid media represents the most efficient and least expensive method, considering that fermented red rice is most often used as such, without performing their extraction. *Monascus* pigments were obtained by growing the fungal strain on medium containing sterilized rice at 35 °C for 10 days.

The alcoholic extract of *Monascus* showed an antioxidant activity of 80 TROLOX Equivalents/mL, which proves that this product can be used as an antioxidant agent in some food products and in packaging that comes into contact with food.

Fermented red rice has a significant antimicrobial action against several species of bacteria and molds and can therefore function as a preservative additive for the meat preparation industry.

In chapter 2.2.2. we approached, together with a research team from the Bucharest National Chemical-Pharmaceutical Research-Development Institute, the obtaining of carotenoid pigments from *Rhodotorula rubra* yeast. Within the project "Development of advanced biotechnologies for the preparation of antioxidant pharmaceutical products with torularhodin and the study of potential therapeutic applications, CNMP-PNCD/61-021/2007", we carried out research on the establishment of the optimal environment and parameters for the development of this yeast and its biosynthesis of torularhodin in liquid media, as well as the extraction and characterization of this pigment.

The culture media used showed a considerable influence on the development of cellular biomass and the biosynthesis of carotenoid pigments, in particular torularhodin.

Extraction of pigments was carried out in n-hexane (total carotenoid pigments) and in basic methanol (extraction of torularhodin, the only acidic component).

For the R1 strain, the highest torularhodin production was determined in the MS3 medium with fructose (626 µg/l medium), followed by the culture in the medium with sucrose and glucose.

The methanol extract containing torularhodin showed both antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* and antifungal activity against *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum* and *Candida utilis* species.

A strong antioxidant activity of the methanol extract of torularhodin was also determined. Subsequent determinations demonstrated that this activity decreases over time, probably due to oxidation processes at the level of C=C double bonds.

The last chapter of the first part, 2.3., "Cultivation of some species of Basidiomycetes to obtain biomass and laccase" in which I proposed to study the possibility of growing fungi from the Basidiomycota phylum on cereals (wheat) and the use of the culture thus obtained in the food industry, in different forms. These research are and will be carried out within the ongoing project "Biosynthesis and use of mushroom mycelium obtained by submerged and surface culture, Contract no. 55/10.10.2023, GNAC ARUT 2023". In parallel, we also pursued the production of enzymes with laccase action, which can be used for the valorization of various waste and by-products generated by the agro-food industry.

The main medicinal mushrooms are characterized by their historical use and their current commercial and medical acceptance, such as: *Ganoderma lucidum* (Reishi or Ling Zhi), *Lentinus (Lentinula) edodes* (Shiitake), *Phellinus linteus*, *Porio cocos*, *Auricularia auricula*, *Hericium erinaceus*, *Grifola frondosa* (Maitake), *Flammulina*

velutipes, *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom), *Trametes (Coriolus) versicolor*, *Tremella fuciformis*, *Schizophyllum commune* and *Cordyceps sinensis* (caterpillar mushroom).

Unlike the traditional cultivation of edible mushrooms, which requires more time and cultivation space and produces variable yields, mycelium (hyphae) cultivation is a current method, which significantly reduces growth time, external contamination and produces a biomass with valuable nutritional properties. In addition, some mushrooms have considerable therapeutic qualities, due to bioactive metabolites synthesized intra- and extracellularly: they have anti-inflammatory, antioxidant, anti-carcinogenic, hypocholesterolemic, anti-diabetic, immunomodulatory and other properties.

By cultivating fungi from the class Basidiomycetes, functional substances from the class polysaccharides, proteins, triglycerides, phenolic compounds, terpenoids, sterols, nucleotides, lactones, unsaturated fatty acids, etc. are obtained.

Some fungi can synthesize enzymes from the class of oxido-reductases (laccase with lignin degradation action) and hydrolases (amylases, cellulases, proteases and others), with a role in the decomposition of organic substrates. These enzymes can be recovered from liquid cultures after biomass separation.

The most widespread wastes from the food industry containing lignocellulosic materials are those of vegetable origin. The main waste of this type is generated by the fruit and vegetable processing industry, milling and baking, extractive industry, beer industry and winemaking.

In this chapter, to obtain fungal biomass and laccase, 5 species of edible mushrooms cultivated in the form of mycelium were used, namely: *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina filiformis* (commercially known as Enoki flower), *Ganoderma lucidum* (also known as Reishi), *Lentinula edodes* (Shiitake) and *Polyporus squamosus*.

The fungi were grown on specific culture media to reveal enzymes with laccase, amylase, proteolytic, lipase and cellulolytic activity and to determine the average growth rates.

Submerged culture using a medium with sugar cane molasses demonstrated that after 3 days of thermostating at 25 °C with shaking at 150 rpm the highest amount of biomass was obtained using the species *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* and *Polyporus squamosus*. The best enzymatic activity of laccase was determined in *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes* cultures.

By cultivating edible medicinal mushrooms in the form of mycelium in liquid media, an easily separated fungal biomass can be obtained, which can be used in the food industry as a food supplement rich in proteins, polysaccharides, vitamins, salts, fibers and

which can contain compounds with activity to improve the production of the immune system.

The second part of the thesis refers to the main perspectives for the evolution and development of the scientific, professional and academic career.

The main research activities that I intend to carry out in the future follow the directions synthesized in the current habilitation thesis, which have only been partially studied and require a more detailed deepening in order to obtain new results, namely the identification and development of new research directions.

The habilitation thesis ends with the bibliographic references that include both the general bibliographic references and the own publications that were the basis of its elaboration.