

## NDIKIMI I IMOBILIZIMIT NË SJELLJEN E MAJASË SË BIRRËS

\*VILMA GURAZI, LULJETA XHAGOLLI, ROZANA TROJA.

Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave të Natyrës, Departamenti i Kimisë Industriale

e-mail: [vgurazi@mail.com](mailto:vgurazi@mail.com)

### Përmbledhje

Proceset me qeliza të lira janë proceset tradicionale periodike të cilat paraqesin disa mangësi, si densiteti i ulët qelizor, kufizimet në ushqimin e mikroorganizmave si dhe më e rëndësishmja lidhet me procesin periodik të prodhimit i cili kërkon kohë shumë të gjatë përgatitore. Sistemet e bioreaktorëve me qeliza të lira nuk mund të operojnë në mënyrë kemostatike e cila dyfishon shpejtësinë e rritjes specifike dhe shpejtësinë e hollimit. Këto 20 – 25 vitet e fundit teknologjia e imobilizimit të qelizave me origjinë imobilizimin e enzimave, ka tërhequr vëmendjen e shumë grupeve kërkimore. Ky proces minimizon një pjesë të mirë të mangësive që shfaq sistemi me qeliza të lira. Avantazhi kryesor që paraqet sistemi me qeliza të imobilizuara është liria për të përcaktuar densitetin e qelizave para procesit të fermentimit. Qëllimi i këtij studimi është studimi i ndikimit me teknika të ndryshme imobilizimi në sjelljen e majasë dhe ecurinë e procesit të fermentimit krahasuar me sjelljen e majasë së lirë në suspension. Ky krahasim është kryer bazuar në ecurinë e fermentimit, konsumit të substratit dhe ecurisë së biomasës në bioreaktor. Majaja e përdorur është specie e *Saccharomyces cerevisiae* e përdorur për fermentimin e birrës, e imobilizuar me metodën me ngecje dhe kapsulim. Kokrrizat e imobilizuara me kapsulim përmbajnë numër më të lartë se ato të imobilizuara me ngecje. Një numër i madh i qelizave në kapsulë tregon se struktura është më e qëndrueshme dhe mbron qelizat e majasë nga mjedisi rrethues duke ruajtur vitalitetin dhe morfologjinë e tyre krahasuar me majanë e lirë në suspension.

**Fjalëkyçe:** Imobilizim, ngecje, kapsulim, fermentim, biomasë, vitaliteti.

### Abstract

Free cell fermentations show disadvantages compared to immobilized cell processes, like low cell density, nutrient limitations and the most important of all, the excessive time needed for the fermentation process. Free cell bioreactors don't operate in a chemostatic mode, where the specific growth and dilution rate are doubled. In the last 20-25 years, the technology of cell and enzyme immobilization, has been of great importance and studied from different scientific groups. Immobilization techniques, minimize and decrease many problems that are present in free cell fermentations. An important advantage of this techniques, is the high density of cell biomass in the bioreactor. The aim of this paper is to study the impact of two different immobilization techniques on the behaviour of yeast cells compared to free cells. This comparison is made in terms of fermentation performance, ethanol production and number of cells/ml. The yeast used is a brewing strain of *Saccharomyces cerevisiae*, immobilized with entrapment and capsulation method. As a conclusion we can say that the immobilized beads have a higher cell concentration compared to free cell suspension. This shows that the matrix protects the cells and their morphology.

**Key words:** Immobilization, entrapment, capsulation, fermentation, biomass, vitality.

## Hyrje

Karakteristikat morfologjike dhe fiziologjike, fermentuese dhe sjellja e majave të imobilizara ndryshojnë nga ato të qelizave të lira. Duke qënë se qelizat e *Saccharomyces cerevisiae* të imobilizuar janë në kontakt me njëra tjetrën, mjedisin rrethues ose të lidhura në suportin imobilizues, ky i fundit mund të konsiderohet si mjedisi natyral i rritjes. Ky mjedis mund të ofrojë stabilitet, dhe mbrojtje ndaj faktorëve të jashtëm por mund të sjelli ndryshime në aktivitetin fiziologjik dhe metabolik të qelizave. Faktorët kryesorë që ndikojnë mbi dy karakteristikat e sipërpërmendura janë: kufizimi në mbartjen e masës, presioni osmotik, ulja e aktivitetit të ujit, komunikimi qelizë-qelizë, etj (Tomas & Vicente, 2005). Ky faktor ndikon më pas në rritje, morfologjinë, fiziologjinë dhe sjelljen e qelizave të majave të cilat pasqyrohen në ecurinë e procesit të fermentimit (Kourkoutas & Bekatorou, 2004). Qëllimi i këtij studimi është përcaktimi i metodës më të mirë të imobilizimit bazuar në efektin minimal negativ mbi qelizat e majasë dhe ecurinë e procesit.

## Materiali dhe metodat

Fermentimi u zhvillua në shkallë laboratorike, në vëllim 250 ml, me musht 12°Bx. U përgatitën tre paralele me 2.5 gr maja të inokuluar, suspension qelizor dhe maja të imobilizuar me dy teknika të ndryshme. Maja e përdorur është maja birre e species *Saccharomyces cerevisiae* me vitalitet 86%.

Numërimi i qelizave u realizua me kamer Thomas si për majanë në suspension dhe në qelizat e imobilizuara. Gjthashtu u monitorua dhe ecuria e fermentimit me anë të ecurisë së përqendrimit të substratit në musht nëpërmjet refraktometrit dixhital. Për këtë studim janë përdorur dy metoda imobilizimi. Të dyja këto metoda kanë në parim inkapsulimin e qelizave të majasë në një membranë gjysmë të përshkueshme e cila lejon shkëmbimin e nutrientëve dhe metabolitëve gjatë procesit të fermentimit (Kourkoutas & Bekatorou, 2004).

### 1. Imobilizimi me ngecje

Tretësira 6% e alginatit të natriumit përzihet me suspensionin qelizor të *Saccharomyces cerevisiae* dhe shtohet me pika në tretësirë  $\text{CaCl}_2$  0.1 M, ky njihet dhe si procesi i ftohjes jonotropike (Figura 1). Kapsulat shpëlahen me ujë të distiluar dhe mbahen në tretësirë  $\text{CaCl}_2$  për 30 min për të rritur qëndrueshmërinë (Duarte & Rodrigues, 2013).

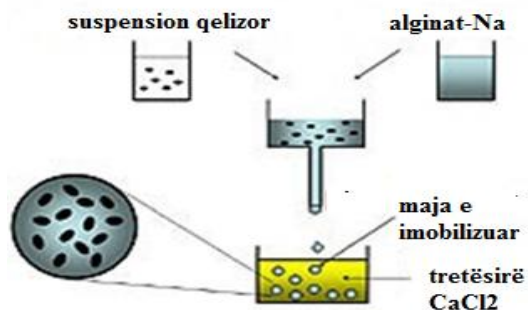


Figura 1: Paraqitja skematike e imobilizimit me ngecje.

## 2. Imobilizim me kapsulim

Në këtë teknikë imobilizimi, përgatitet tretësirë 1.3%  $\text{CaCl}_2$  dhe 1.3% CMC (karboksimetilcelulozë) e cila përzihet me suspensionin qelizor të majasë (Figuraz 2). Më pas hidhet me pika në tretësitën e alginatit të natriumit 0.6% dhe ruhen për 30min në tretësirë  $\text{CaCl}_2$  për të rritur qëndrueshmërinë e kapsulave (Rathone & Desai, 2013; Canaple 2002 ).

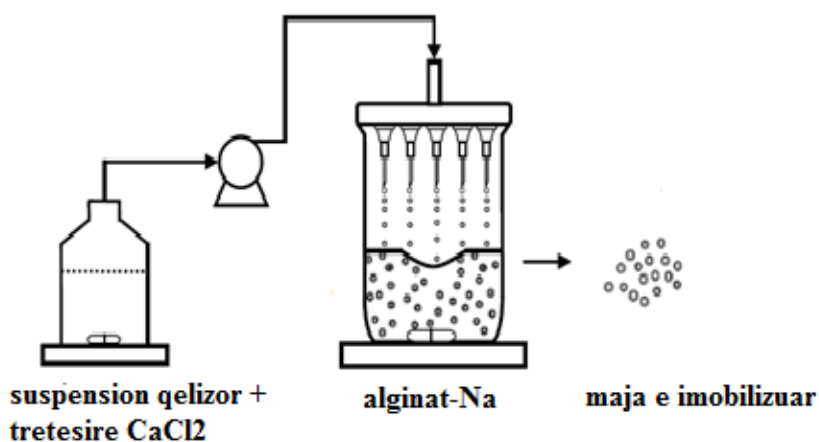
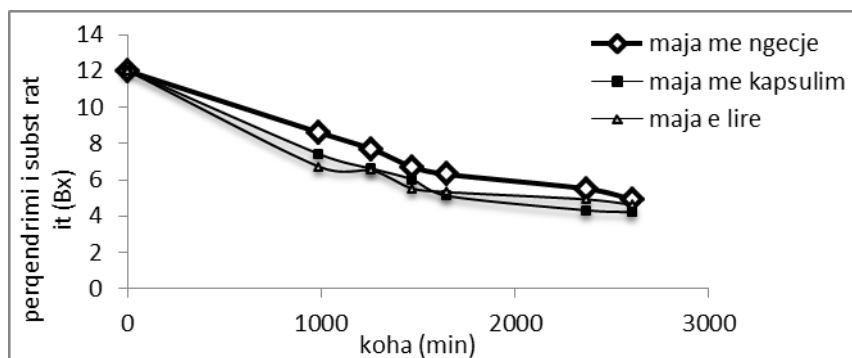


Figura 2: Paraqitja skematike e imobilizimit me kapsulim.

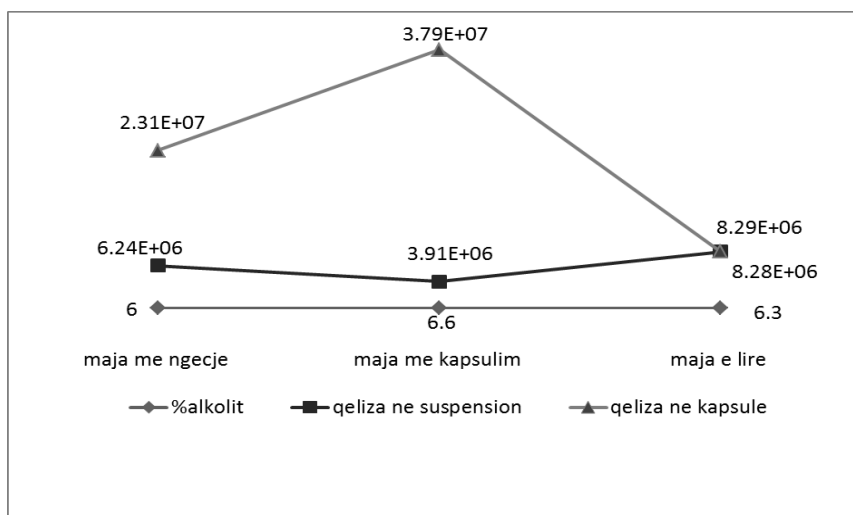
## Rezultate dhe diskutime

### 1. Ecuria e precesit të fermentimit për maja të lirë dhe të imobilizuar



**Grafiku 1:** Paraqitja grafike e ecurisë së fermentimit për maja të imobilizuar dhe të lirë. Varësia e përqëndrimit të substratit ndaj kohës.

Krahasuar me majanë e lirë, fermentimet me maja të imobilizuar janë pothuajse njësoj (Grafiku 1). Arrihet fundi i fermentimit në rreth 6 °Bx për 41 orë dhe përafërsisht në të njëjtën përqindje të alkoolit (Grafiku 2). Ecuaria e fermentimi me maja të imobilizuar me ngecje është më e njëtrajtshme por fillon fermentimin më pas se procesi me maja të kaspuluar dhe ajo e lirë, kjo për shkak të shtresës më të qëndrueshme të alginatit, në kokrrizën e imobilizuar, krahasuar me majanë e kapsuluar. Vihet re se për shkak të strukturës më të qëndrueshme të kapsulës në imobilizimin me ngecje, diametri i kësaj të fundit është më pak i ndryshueshëm (Tabela 1). Diametri i kapsulave rritet gjatë fermentimit mesatarisht 1,5- 2mm.



**Grafiku2:** Paraqitja grafike e etanolit dhe biomasës në suspension dhe në kapsulë, në fund të procesit të fermentimit me maja të imobilizuar dhe të lirë.

Në fund të procesit të fermentimit është bërë numërimi i qelizave në kapsulë (Grafiku 2). Nga ky grafik mund të themi se numri i qelizave/ml është më i madh në rastin e majave të imobilizuar në krahasim me majanë e lirë.

Gjithashtu mund të themi se metoda e cila ka humbje më të vogël të qelizave, nga lëshimi i strukturës së imobilizuar, është ajo me kapsulim por shfaq vitalitet më të ulët të qelizave në krahasim me metodën e imobilizuar me ngecje (Tabela 1).

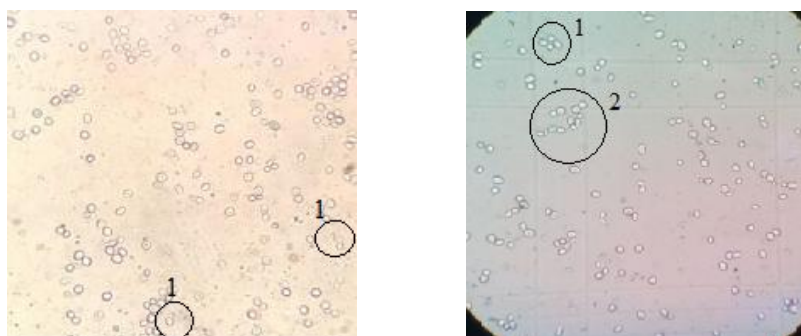
**Tabela 1:** Vitaliteti i qelizave në kapsulë fund të fermentimit krahasuar me majanë e lirë në suspension dhe diametri kokrrizave para dhe pas fermentimit.

	Vitaliteti	Diametri para fermentimit	Diametri pas fermentimit
maja me ngecje	89.60%	3mm	4.5mm
maja me kapsulim	86.70%	5.5mm	7.5mm
maja e lirë në suspension	70.10%	-	-

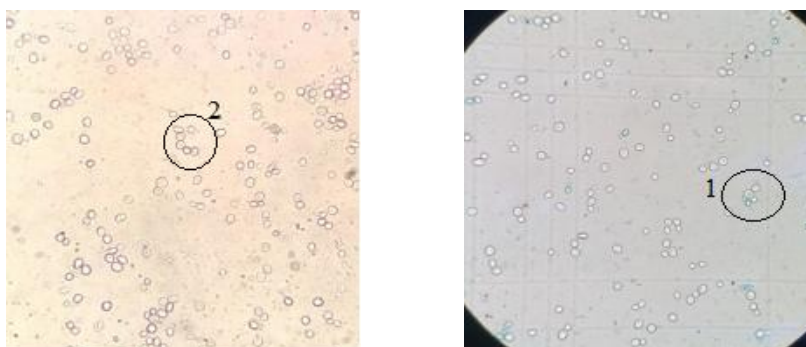
Kjo sepse shkëmbimi i metabolitëve në këtë rast bëhet më shpejt dhe lehtësisht për shkak të strukturës me të hollë të kapsulës së imobilizimit në rastin e imobilizimit me kapsulim.

## 2. Ndikimi i imobilizimit në morfologjinë e majave

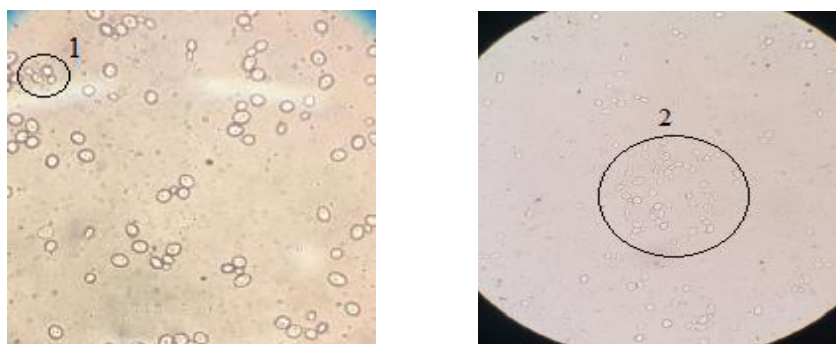
Nga vëzhgimi në mikroskop i majave të imobilizuara dhe të lira, para dhe pas fermentimit, vihet re se imobilizimi nuk prek morfologjinë e qelizave të majave dhe gjithashtu ruan vitalitetin e tyre. Në krahasim me majanë e lirë qelizat e majasë së imobilizuar, në të dyja rastet, shfaqin një bulëzim më të mirë para se të filloj fermentimi, i cili ruhet edhe në fund të procesit (Figura 3,4,5). Në imobilizimin me ngecje qelizat kanë tendencën që të formojnë pseudomicelin tipik, kjo nuk vihet re në rastin e imobilizimit me kapsulim. Bulëzimi është unilateral por në imobilizimin me kapsulim vihet re se favorizohet dhe bulëzimi multilateral.



**Figura 3:** Maja e imobilizuar me ngecje para dhe pas fermentimit, 1- maja në bulëzim, 2-pseudomiceli.



**Figura 4:** Maja e imobilizuar me kapsulim para dhe pas fermentimit, 1- maja në bulëzim, 2-pseudomiceli



**Figura 5:** Maja e lirë para dhe pas fermentimit, 1- maja në bulëzim, 2-pseudomiceli

### Përfundime

- Një numër i madh i qelizave në kapsulë tregon se struktura është e qëndrueshme dhe mbron qelizat e majasë nga mjedisi rrethues në krahasim me qelizat e lira në suspension.
- Vitaliteti i qelizave është më i lartë në qelizat e imobilizuara në krahasim me majanë e lirë në suspension. Metoda e cila ruan vitalitetin më të lartë të qelizave të majasë është ajo me ngecje për shkak të strukturës më të qëndrueshme të alginatit.
- Gjatë procesit të fermentimit struktura e alginatit lëshohet duke rritur diametrin e kokrrizave dhe numrin e qelizave në suspension.
- Majaja e imobilizuar është lehtësisht e rikuperueshme në fund të procesit të fermentimit duke bërë të mundur ripërdorimin e saj në procese pasardhëse. Nga vazhdimi i studimit është parë se kapsulat mund të përdoren deri në 6 cikle fermentimi.
- Ecuria e fermentimeve me dy metodat e ndryshme të imobilizimi nuk shfaqin ndryshime të konsiderueshme, përveç se në fillimin e procesit ku vihet re se fermentimi me maja të imobilizuar me ngecje, si rezultat i strukturës më të qëndrueshme të suportit imobilizues.
- Morfologjia e qelizave të majave, nuk prishet gjatë imobilizimit dhe favorizon një zvillim dhe bulëzim të mirë të tyre.

**Literatura**

Branik, T., Vicente, A.A., Dostalek, P. and Teixeira, J.A. (2005): Continuous Beer Fermentation Using Immobilized Yeast Cell Bioreactor Systems. American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineering, vol 21: 653-663

Duarte, J. C., Rodrigues, J.A.R., Moran, P.J., Valença, G.P. and Nunes, J. (2013): Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express a Springer open Journal*, vol 3:31

Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R and Koutinas, A.A. (2004): Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Elsevier Food Microbiology*, vol 21: 377-397

Rathone, S., Desai, P.M., Liew, C.V., Chan, L.W., Heng, P.W.S. (2013): Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116(2) 369-381

Canale, L. (2002): Improving cell encapsulation through size control. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* vol 13: 783-796

Berlowska, J., Kregiel, D., Ambroziak, W. (2013): Physiological tests for yeast brewery cells immobilized on modified chitosan carrier. *Antonie van Leeuwenhoek* 104: 703-714

Gorecka, E. and Jastrzebska, M. (2011): Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science* 75(1): 65-86

Holcberg I. B., Margalith P. (1981): Alcoholic Fermentation by Immobilized Yeast at High Sugar Concentrations. *European J. Appl Microbiol Biotechnol* vol 13:133-140

Immobilization of yeast cells for alcoholic Production. Accessed at;

<http://www.stu.edu.vn/uploads/documents/030509-214525.pdf>