

**OPTIMIZAREA MATEMATICĂ A MEDIULUI DE CULTURĂ PENTRU  
PRODUCEREA  $\beta$ -GLUCANILOR LA TULPINA  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CNMN-Y-20**

*Natalia CHISELIȚA, Agafia USATÎI, Elena MOLODOI,  
Nadejda EFREMOVA, Ludmila FULGA, Tamara BORISOVA*

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM*

În acest studiu sunt reflectate rezultatele optimizării mediului de cultivare pentru *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 în vederea sporirii conținutului de  $\beta$ -glucani. Evidențierea ingredientelor mediului de cultivare cu efect stimulator (cum ar fi sursa de carbon și acetatul de zinc) a fost efectuată aplicând algoritmul Yates. Concentrațiile componentelor mediului de cultură optimizat sunt, g L<sup>-1</sup>: zaharoză – 37,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3,0; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O – 0,7; NaCl – 0,5; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – 0,4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; acetat de zinc – 0,00816; autolizat de drojdii – 10 ml. Mediul optimizat utilizat pentru cultivarea tulpinii de drojdie se caracterizează prin obținerea a 29,47±0,52%  $\beta$ -glucani în biomasa uscată, sau cu 31,8% mai mult decât mediul inițial.

**Cuvinte-cheie:** *Saccharomyces cerevisiae*,  $\beta$ -glucani, medii de cultură, optimizare.

**THE MATHEMATICAL OPTIMIZATION OF CULTURE MEDIUM FOR  
B- GLUCANES PRODUCTION BY SACCHAROMYCES CEREVISIAE CNMN-Y-20**

This paper contains results of optimization of culture medium for *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 with aim to increase  $\beta$ -glucans content. The selection of components of culture medium (carbon sources, zinc acetate) with stimulatory effect was carried out by applying the Yates algorithm. Concentrations of optimized culture medium components g L<sup>-1</sup>: saccharose – 37,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3,0; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O – 0,7; NaCl – 0,5; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – 0,4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; zinc acetate – 0,00816; yeast autolysate – 10 ml. Optimized medium used for cultivation of yeast strain is characterized by obtaining 29,47 ± 0.52%  $\beta$ -glucans per dry biomass or 31,8% more than the original medium.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*,  $\beta$ -glucans, culture media, optimization.

**Introducere**

Interes comercial prezintă polizaharidele peretelui celular al levurilor, care pot fi utilizate în industria alimentară, farmaceutică, cosmetică. Ținând cont de siguranța în cadrul de sănătate publică, până în prezent doar glucanii și manoproteinele levurilor *Saccharomyces cerevisiae* au fost acceptate pentru de a fi utilizate pe larg.

$\beta$ -glucanii au o semnificație biomedicală deosebită, datorită activității lor antivirale și antibacteriene [17], imunomodulatoare și imunostimulatoare [8,22], anticancerigene [20,21,25]. Derivații sulfatați ai  $\beta$ -glucanilor au demonstrat *in vitro* activitate antiproliferativă împotriva celulelor sarcomei 180 (S-180) [23]. Mai mult ca atât,  $\beta$ -glucanii prezintă substanța activă de bază la elaborarea noilor vaccinuri anticancerigene polivalente, care sunt actualmente în curs de dezvoltare [16]. În combinație cu alte substanțe biologice active  $\beta$ -glucanii au capacitatea de a reduce conținutul toxinelor din tractul digestiv, mecanismul acestui proces fiind bazat pe complexarea toxinelor cu catena polizaharidică cu ajutorul legăturilor de hidrogen și Van der Waals [24].

Glucanii intră în structura stratului interior al peretelui celular al levurilor genului *Saccharomyces* [11]. În general, structura și dinamica compoziției chimice a peretelui celular sunt legate de schimbările în starea fiziologică a celulei și de reacția la influența factorilor externi. Arhitectura peretelui unei celule și mecanismele responsabile de sinteza componentelor acestuia pot fi controlate de componența mediului de cultură [10,12,13].

Pentru o bună dezvoltare și derulare a proceselor metabolice pentru tulpinile de drojdie, este necesar ca în mediul de cultură să fie incluse surse de carbon, azot, alți factori de creștere în concentrații specifice tulpinii [3]. În calitate de sursă de carbon utilizată pentru fermentare și pentru a spori randamentul producerii de glucani de către *S. cerevisiae* pot fi nominalizate glucoza, zaharoza, lactoza, fructoza, maltoza, manoza, amidonul [7]. Glucoza este cotată ca cea mai importantă sursă pentru biosinteza glucanilor și mananilor [6]. În calitate de sursă de azot organic pentru fermentare se aplică peptona și extractul de levuri, combinate cu surse de azot anorganic, cum sunt sulfatul de amoniu, azotatul de potasiu, cazeina [2,15].

Reieșind din faptul că compoziția biomasei de levuri ar putea fi modificată în mod semnificativ prin intermediul mediului de nutriție și prin condițiile de cultivare, pentru producția înaltă de glucani este important a optimiza acești factori pentru producătorii identificați.

**Scopul cercetărilor.** Optimizarea mediului de cultură pentru producerea maximală a  $\beta$ -glucanilor la tulpina de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20.

### Material și metode

**Obiect de cercetare** – tulpina de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 selectată ca producător de  $\beta$ -glucani [4].

**Medii de cultură.** S-a utilizat mediul pentru însămânțare must de bere [1], mediile de fermentare Rieder, g L<sup>-1</sup>: 30,0 – glucoză, 3,0 – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,7 – MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0,5 – NaCl, 0,4 – Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1,0 – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 ml autolizat de levuri, apă potabilă 1 L, pH – 5,0-6,0 [1], YPD, g L<sup>-1</sup>: 20,0 – peptonă, 20,0 – glucoză, 10 ml extract de levuri, apă potabilă 1 L, pH – 5,5 [14], mediul M-4086, g L<sup>-1</sup>: 3,0 – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,7 – MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0,5 – NaCl, 0,4 – Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1,0 – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20,0 – melasă, 5,0...10,0 mg – clorură de tricloracetat de zinc, 10 ml autolizat de levuri, apă potabilă 1 L, pH – 5,0 [5].

**Condiții de fermentare.** Mediul de fermentare a fost însămânțat cu 5 ml inocul (2x10<sup>6</sup> celule/ml), turbiditatea se măsoară ca densitate optică (DO) prin spectrofotometrie cu utilizarea lungimii de undă  $\lambda=600$  nm [18]. Cultivarea tulpinii de drojdie s-a realizat în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1 L ce conține 0,2 L mediu de cultură, pe agitator rotativ (200 rpm), la temperatura de 25°C, durata de cultivare în profunzime 120 ore.

**Metode de investigație.** Biomasa levuriană s-a determinat gravimetric, prin centrifugare la 3000 g, timp de 15 min., resuspendarea depozitului de celule cu apă distilată sterilă, centrifugare repetată. Celulele au fost colectate, uscate la 105°C timp de 5 ore în etuvă, apoi biomasa de levuri a fost cântărită la balanța AQT-250 (2005) [14]. Carbohidrații totali în biomasa de levuri s-au determinat la spectrofotometrul T60 VIS Spectrophotometer, la lungimea de undă 620 nm cu utilizarea reactivului antron și a D-glucozei în calitate de standard [9]. Conținutul de  $\beta$ -glucanii a fost determinat gravimetric conform procedurii prezentat în [19]. Conținutul de oxigen dizolvat în mediu s-a măsurat cu oximetrul portabil – Oxi-315i/SET 2B10-0011 (2008). Valorile pH-ului mediului au fost determinate cu pH-316i MeBketten WTW, Germania (2008). Optimizarea componenței mediului de nutriție s-a efectuat conform metodelor de planificare matematică a experiențelor [26].

Analiza statistică a rezultatelor s-a efectuat computerizat cu calcularea erorilor standard pentru valorile relative și medii, cu ajutorul setului de programe Statistica 7.

### Rezultate și discuții

Pentru selectarea unui mediu nutritiv adecvat pentru optimizare au fost studiate particularitățile de creștere a tulpinii și conținutul de  $\beta$ -glucani la cultivare pe diferite medii nutritive. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 1.

**Tabelul 1**

#### Conținutul de biomasă celulară și de $\beta$ -glucani la cultivarea tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 pe diferite medii

| Tipul de mediu | Biomasa uscată, g/L | $\beta$ -glucani, % la B.U. |
|----------------|---------------------|-----------------------------|
| YPD            | <b>4,59±1,06</b>    | 19,06±0,09                  |
| Rieder         | 2,09±0,03           | <b>22,36±0,57</b>           |
| M - 4086       | 3,97±0,04           | 12,61±0,45                  |

După cum reflectă rezultatele obținute în cercetările întreprinse, un nivel maximal al cantității de biomasă se obține la cultivarea tulpinii pe mediile YPD și M-4086. Mediul Rieder nu asigură o creștere suficientă a biomasei celulare, dar este eficient din punctul de vedere al acumulării în peretele celular a cantității maxime de  $\beta$ -glucani (22,36 ± 0,57% la B.U.). Conform rezultatelor prezentate în tabelul de mai sus, drept factori inițiali pentru optimizarea mediului de fermentație au fost alese unele elemente ale mediului Rieder.

Optimizarea mediului Rieder în scopul obținerii unei cantități sporite de  $\beta$ -glucani a fost efectuată în câteva etape consecutive. Primul pas a constituit determinarea dependenței acumulării  $\beta$ -glucanilor de concentrația unui factor pe fonul stabilității celorlalte componente ale mediului. Cercetările în direcția dată au permis a stabili zonele ce redau dependența productivității culturii de concentrația factorului.

Rezultatele experiențelor monofactoriale pentru compoziții mediului de nutriție au fost supuse analizei statistice și regresionale. După prelucrarea rezultatelor au fost evidențiați pentru mediul Rieder doi factori esențiali: zaharoza și acetatul de zinc ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn), care pot influența semnificativ biosinteza  $\beta$ -glucanilor.

Retultatele acestor investigații au stat la baza optimizării matematice a mediului de cultură pentru levura *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 în vederea obținerii conținutului maximal de  $\beta$ -glucani.

Optimizarea mediului a fost efectuată în câteva etape consecutive: experiența conform planului „Experiența factorială fracționată (EFF2<sup>2</sup>)”, în timpul căreia se determină direcția varierii concentrației factorilor (spre mărirea sau micșorarea concentrației) și experiența conform planului „Mișcarea pe gradient”, în timpul căreia se alege cea mai reușită combinație a factorilor esențiali și neesențiali.

Evidențierea factorilor cu efecte pozitive în procesul de acumulare a  $\beta$ -glucanilor a fost efectuată în câteva trepte, utilizând metoda balanței aleatoare. La fiecare treaptă au fost selectate efectele cu valoare esențială.

Inițial a fost elaborat planul experienței factoriale fracționate EFF 2<sup>2</sup> (Tab.2).

Tabelul 2

Informația inițială despre factori

| Componenta mediului                | Codificarea    | Concentrația componentelor |        |            | Pasul de variație, $\lambda(i)$ |
|------------------------------------|----------------|----------------------------|--------|------------|---------------------------------|
|                                    |                | Minimă - 1                 | Baza 0 | Maximă + 1 |                                 |
| Zaharoza, g L <sup>-1</sup>        | X <sub>1</sub> | 30                         | 35     | 40         | 5                               |
| Acetat de zinc, mg L <sup>-1</sup> | X <sub>2</sub> | 10                         | 15     | 20         | 5                               |

Obținând rezultatele experienței EFF 2<sup>2</sup> au fost calculați coeficienții de regresie după algoritmul Iets [26] (Tab.3).

Tabelul 3

Calcularea coeficienților de regresie după algoritmul Iets

| Planul experienței |                | Rezultate experimentale (Y)<br>$\beta$ -glucani, % la S.U. | Calculul efectelor                      |   | Coeficientul liniar de regresie, $b(i)$ |
|--------------------|----------------|--|---|---|---|
| X <sub>1</sub>     | X <sub>2</sub> |  | Pasul 1                                 | Pasul 2   |   |
| -                  | -              | 20,82  | Y <sub>1</sub> +Y <sub>2</sub> = 44,91  | Y <sub>1</sub> +Y <sub>2</sub> + Y <sub>3</sub> +Y <sub>4</sub> = 96,41   | 24,10                                   |
| +                  | -              | 24,09  | Y <sub>3</sub> +Y <sub>4</sub> = 51,5   | -Y <sub>1</sub> +Y <sub>2</sub> - Y <sub>3</sub> +Y <sub>4</sub> = - 1,93 | - 0,482                                 |
| -                  | +              | 28,35  | Y <sub>2</sub> -Y <sub>1</sub> = 3,27   | -Y <sub>1</sub> -Y <sub>2</sub> + Y <sub>3</sub> +Y <sub>4</sub> = 6,59   | 1,647                                   |
| +                  | +              | 23,15  | Y <sub>4</sub> -Y <sub>3</sub> = - 5,27 | Y <sub>1</sub> -Y <sub>2</sub> - Y <sub>3</sub> +Y <sub>4</sub> = - 8,47  | - 2,117                                 |

Pe baza coeficienților de regresie calculați a fost alcătuită ecuația de regresie, care are expresia:

$$Y = 24,10 - 0,482 X_1 + 1,647 X_2 - 2,117 X_1 X_2$$

În corespundere cu ecuația dată a fost montată experiența „Mișcarea pe gradient”, conform planului din Tabelul 4.

Tabelul 4

Planul experiențelor „Mișcarea pe gradient”

| Valorile  | Factorii                 |   | Biomasa uscată, g L <sup>-1</sup> | $\beta$ -glucani, % la B.U. |
|---|--------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------|
|   | Zaharoza, X <sub>1</sub> | Acetat de zinc, X <sub>2</sub>                                  |                                   |                             |
| Coeficient liniar de regresie, $b(i)$           | - 0,482                  | 1, 647  |                                   |                             |
| Unități de variație, $\lambda(i)$               | 5                        | 5   |                                   |                             |
| $b(i) \cdot \lambda(i)$                         | - 2,41                   | 8,235   |                                   |                             |
| Coeficient de proporționalitate, K <sub>i</sub> | 1                        | $b(i) \cdot \lambda(i)x_2 / b(i) \cdot \lambda(i)x_1$<br>- 3,42 |                                   |                             |
| Pasul pantei maximale, $H(i)$                   | 2                        | -3,42 · 2 = -6,84   |                                   |                             |
| Baza experimentului                             | 35                       | 15  |                                   |                             |

| Concentrația | g L <sup>-1</sup> | mg L <sup>-1</sup> |           |                   |
|--------------|-------------------|--------------------|-----------|-------------------|
| 1            | 35,0              | 15,0               | 1,72±0,13 | 23,59±0,46        |
| 2            | 37,0              | 8,16               | 1,73±0,01 | <b>29,47±0,52</b> |
| 3            | 39,0              | 1,4                | 1,73±0,08 | 29,25±0,08        |
| 4            | 41,0              | - 5,52             | 1,91±0,01 | 29,16±0,61        |
| 5            | 43,0              | - 12,36            | 1,97±0,01 | 25,86±0,73        |

Conform datelor din Tabelul 4, nivelul maximal de sinteză a  $\beta$ -glucanilor ( $29,47 \pm 0,52\%$  la B.U.) pentru tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 este determinat de următoarea componență cantitativă a mediului nutritiv, g L<sup>-1</sup>: zaharoză – 37,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3,0; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O – 0,7; NaCl – 0,5; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – 0,4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; acetat de zinc – 0,00816; autolizat de drojzii – 10 ml; apă potabilă – 1 L, pH – 5,0-6,0, care a fost numit convențional R-ZZ.

Astfel, prin analiza regresională au fost determinate concentrațiile optime ale sursei de carbon (zaharoză) și ale acetatului de zinc în componența mediului nutritiv pentru obținerea  $\beta$ -glucanilor la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. Cercetările efectuate au finalizat cu elaborarea unui nou mediu de nutriție – R-ZZ pentru cultivarea levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, care permite obținerea până la  $29,47 \pm 0,52\%$   $\beta$ -glucani, față de  $22,36 \pm 0,57\%$  pe mediul martor Rieder, ceea ce este cu 31,8% mai mult față de mediul inițial. Comparativ cu mediile YPD sau M - 4086 (pe care tulpina sintetizează  $19,06 \pm 0,09\%$ , respectiv,  $12,61 \pm 0,45\%$   $\beta$ -glucani), eficiența mediului optimizat R-ZZ este net superioară.

### Concluzii

1. La cultivarea tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 pe mediile nutritive utilizate în prezent, mai convenabil pentru biosinteza  $\beta$ -glucanilor poate fi considerat mediul Rieder, iar pentru dezvoltarea și multiplicarea levurii – mediile YPD și M-4086.
2. Optimizarea compoziției mediului Rieder cu aplicarea metodei matematice de planificare a experiențelor a condus la elaborarea unui mediu nutritiv eficient care asigură obținerea cu 31,8% mai mult  $\beta$ -glucani comparativ cu mediul inițial.

### Bibliografie:

1. ANGHEL, I., VASSU, T., SEGAL, B. et. al. *Biologia și tehnologia drojdiilor*. București: Editura Tehnică, 1993. vol.3. 308 p.
2. ANGHEL, I., VOICA, C., TOMA, N. și al. *Biologia și tehnologia drojdiilor*. București: Editura Tehnică, 1991, vol.2. 385 p.
3. AGUILAR-USCANGA, B., FRANCOIS, J.M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. In: *Letters in Applied Microbiology*, 2003, vol.37, p.268-274.
4. Brevet de invenție. 4048 B1, MD, C12N 1/16 Tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* – sursă de  $\beta$ -glucani // Chiselița O., Usatii A., Taran, N., Rudic, V., Chiselița, N., Adajuc V. (MD). Cererea depusă 2010.02.11, BOPI nr. 6/2010.
5. Brevet de invenție. 4086 MD, C12N 1/16, C 12 F 7/64 Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 // Chiselița O., Usatii A., Chiselița, N., Gulea Aurelian. (MD). Cererea depusă 2010.09.08, BOPI nr.12/2010.
6. BELINCHÓN, M.M., GANCEDO, J.M. Glucose controls multiple processes in *S. cerevisiae*. through diverse combinations of signaling pathways. In: *FEMS Y. Res.*, 2007, vol.7(6), p.808–818.
7. BERTHELS, N.J., et al. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *S. cerevisiae* wine yeast strains. In: *FEMS Y. Res.*, 2004, vol.4(7), p.683-689.
8. CHAUNG, H.C., HUANG, T.C., YU, J.H. et. al. Immunomodulatory effects of beta-glucans on porcine alveolar macrophages and bone marrow haematopoietic cell-derived dendritic cells. In: *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009, vol.131(3-4), p.147-157.
9. DEY, P., HARBORNE, J. *Methods in Plant Biochemistry*. Carbohydrats Academic Press, 1993, vol.2, 529 p.
10. KLIS, F.M., et al. Dynamics of cell wall structure in *S. cerevisiae*. In: *FEMS Microbiol. Rev.*, 2002, vol.26, p.239-256.
11. KOGAN, G., KOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. In: *Live-stock Science*, 2007, vol.109, no.1-3, p.161-165.
12. LATGÉ, J.-P. The cell wall: a carbohydrates armour for the fungal cell. In: *Mol. Microbiol.*, 2007, vol.66(2), p.279-290.
13. LESAGE, G., BUSSEY, H. Cell Wall Assembly in *S. cerevisiae*. In: *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.*, 2006, vol.70(2), p.317-343.

14. HONG-ZHI, Liu, QIANG, Wang, YUAN-YUN, Liu et. al. Statistical Optimization of Culture Media and Conditions for Production of Mannan by *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2009, vol.14, p.577-583.
15. PARROU, J., et al. Dynamic responses of reserve carbohydrates metabolism under carbon and nitrogen limitation in *S. cerevisiae*. In: *Yeast*, 1999, vol.15, p.191-203.
16. RAFAEL, O, AFRICA, G., MARTIN-LOMAS, M., PENADÉS, S. Preparation of multifunctional glyconanoparticles as a platform for potential carbohydrate-based anticancer vaccines. In: *Carbohydrate Research*, 2007, 342(3-4), p.448-459.
17. RONDANELLI, M., OPIZZI, A., MONTEFERRARIO, F. The biological activity of beta-glucans. In: *Minerva Med.* 2009, 100(3), p.237-245.
18. RUIZ-GOMEZ, M.J., PRIETO-BARCIA, M.I., RISTORI-BOGAJO, E. et. al. Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Bioelectrochemistry*, 2004, vol.64, p.151-155.
19. THAMMAKITI, S., SUPHANTHARIKA, M., PHAESUWAN, T. et. al. Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans for potential applications in the food industry. In: *International Journal of Food Science & Technology*, 2004, vol.39(1), p.21-29.
20. TUBIANA, M. Prevention of cancer and the dose-effect relationship: the carcinogenic effects of ionizing radiations. In: *Cancer Radiother.* 2009, vol.13(4), p.238-258.
21. VOLMAN, J.J., MENSINK, R.P., RAMAKERS, J.D., et al. Dietary (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)-beta-D-glucans from oat activate nuclear factor-kappaB in intestinal leukocytes and enterocytes from mice. In: *Nutr Res.*, 2010, vol.30(1), p.40-48.
22. VOLMAN, J.J., RAMAKERS, J.D., PLAT, J. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. In: *Physiol. Behav.*, 2008, vol.23/94(2), p.276-284.
23. XIAOHUA, W., LINA, Z. Physicochemical properties and antitumor activities for sulfated derivatives of lentinan. In: *Carbohydrate Research*. 2009, 344(16), p.2209-2216.
24. YIANNIKOURIS, A., FRANÇOIS, J., POUGHON, L., et al. Influence of pH on Complexing of Model  $\beta$ -D-Glucans with Zearalenone. In: *Journal of Food Protection*, 2004, 67(12), p.2741-2746.
25. YOON TAEK, J., KIM TACK, J., LEE, H. et.al. Anti-tumor metastatic activity of  $\beta$ -glucan purified from mutated *Saccharomyces cerevisiae*. In: *International Immunopharmacology*, 2008, 8(1), p.36-42.
26. МАКСИМОВ, В. *Многофакторный эксперимент в биологии*. Москва: МГУ, 1980. 280 с.

Prezentat la 05.03.2013