

UNIVERSITATEA DUNĂREA DE JOS GALAȚI  
FACULTATEA DE ȘTIINȚA ȘI INGINERIA ALIMENTELOR

**INDICATORI DE DIFERENȚIERE AI TRATAMENTELOR  
TERMICE APLICATE ÎN INDUSTRIA LAPTELUI**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

Doctorand:

**Ing. Loredana DUMITRAȘCU**

Conducător științific:

**Prof.dr.ing. Gabriela Cătălina ROTARU**

GALAȚI, 2012



ROMÂNIA  
UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS”  
DIN GALAȚI



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
CERCETĂRII  
TINERETULUI  
ȘI SPORTULUI

C/2375/23.11.2012

Către

Universitatea “ Dunărea de Jos “ din Galați vă face cunoscut că în data de 17.12.2012, ora 12.00, în sala F103 a Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată: ”INDICATORI DE DIFERENȚIERE AI TRATAMENTELOR TERMICE APLICATE ÎN INDUSTRIA LAPTELUI”, elaborată de domnul/doamna DUMITRAȘCU LOREDANA, în vederea conferirii titlului științific de doctor în Domeniul de doctorat - Inginerie industrială.

Comisia de doctorat are următoarea componență :

- 1. Președinte:** Prof.univ.dr.ing. Petru ALEXE  
*Universitatea ”Dunărea de Jos” din Galați*
- 2. Conducător de doctorat:** Prof.univ.dr.ing. Gabriela-Cătălina ROTARU  
*Universitatea ”Dunărea de Jos” din Galați*
- 3. Referent oficial:** Prof.univ.dr.ing. Violeta NOUR  
*Universitatea din Craiova*
- 4. Referent oficial:** Prof.univ.dr. Stefana JURCOANE  
*Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București*
- 5. Referent oficial:** Conf.univ.dr.ing. Nicoleta STĂNCIUC  
*Universitatea ”Dunărea de Jos” din Galați*

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

RECTOR,

Prof.univ.dr.ing. Gabriela BIRSAN



Str. Domnească nr.47, cod poștal 800008, Galați, România, Tel.: +40 336. 130. 109, Fax: +40 236. 461. 353  
Web: www.ugal.ro e-mail: rectorat@ugal.ro

---

## Mulțumiri

Doresc să îmi exprim recunoștința față de conducătorul meu de doctorat prof.dr.ing. **Gabriela Cătălina Rotaru** pentru răbdarea și sprijinul acordat în elaborarea acestei lucrări de doctorat. Îi mulțumesc de asemenea doamnei profesoare, pentru bunătatea și căldura cu care m-a primit în familia dumneaei.

Mulțumesc colegilor mei pentru susținerea oferită pe parcursul pregătirii mele doctorale și, în mod special conf.dr.ing **Nicoleta Stănciuc** care, mi-a demonstrat că pot face performanță și în România. Succesul obținut se reflectă în standardele înalte pe care mi le-a impus încă de la începutul colaborării. Mulțumesc din suflet, Nico!

Le mulțumesc prietenilor mei, care au dat dovadă de multă răbdare și mi-au fost alături la nevoie.

Mulțumesc familiei, care a trăit sufletește alături de mine fiecare etapă din această teză.

Nu în ultimul rând, îi mulțumesc Bunului Dumnezeu pentru că mi-a oferit speranța, credința și energia să pot finaliza cu bine această etapă din viață.

**Loredana**

---

## CUPRINS

<b>OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT</b> .....	1
A. Obiectivele științifice ale tezei de doctorat.....	1
B. Prezentarea generală a tezei de doctorat.....	4
<b>I PARTEA DOCUMENTARĂ</b>	
<b>CAPITOLUL 1</b>	
<b>LAPTELE MATERIE PRIMĂ-ANALIZĂ COMPARATIVĂ INTERSPECII</b>	
1.1 Compoziția generală a laptelui de oaie, capră și vacă.....	7
1.2 Proteinele laptelui.....	9
1.3 Lipidele laptelui.....	9
1.4 Enzimele laptelui.....	10
1.5 Microbiologia de contaminare a laptelui crud.....	11
1.6 Asigurarea calității laptelui.....	13
1.6.1 Prevenirea contaminării .....	13
1.6.2 Optimizarea proceselor termice.....	14
1.6.2 Evaluarea autenticității .....	14
1.7 Bibliografie.....	15
<b>CAPITOLUL 2</b>	
<b>TRATAMENTE TERMICE APLICATE ÎN INDUSTRIA LAPTELUI</b>	
2.1 Tipuri de tratamente termice aplicare în industria laptelui.....	17
2.2 Efectele tratamentului termic asupra calității laptelui.....	20
2.3 Evaluarea eficienței tratamentelor termice.....	21
2.4 Indicatori de diferențiere ai tratamentelor termice de pasteurizare.....	23
2.4.1 $\beta$ -lactoglobulina.....	23
2.4.2 $\alpha$ -lactalbumina.....	25
2.4.3 Fosfataza alcalină.....	27
2.4.3.1 Definiție și caracterizare.....	27
2.4.3.2 Importanță.....	28
2.4.3.3 Metode de determinare a fosfatazei alcaline.....	29
2.4.3.4 Limitări privind eficiența evaluării fosfatazei alcaline.....	30
2.4.4 $\gamma$ -glutamil transferaza.....	32
2.4.4.1 Definiție și caracterizare.....	32
2.4.4.2 Concentrația și distribuția enzimei în lapte.....	33
2.4.4.3 Cuantificarea activității enzimaticе.....	34
2.4.4.4 Importanță.....	34
2.4.5 Lactoperoxidaza.....	35

2.4.5.1 Caracterizare fizico-chimică.....	36
2.4.5.2 Concentrația de lactoperoxidază în lapte.....	37
2.4.5.3 Componentele de activare a sistemului LP.....	38
2.4.5.4 Mecanismul de reacție al sistemului LP.....	39
2.4.5.5 Activitatea antimicrobiană a sistemului LP.....	40
2.4.5.6 Aplicații în industria laptelui.....	43
2.5 Bibliografie.....	46

## II PARTEA EXPERIMENTALĂ

### CAPITOLUL 3

#### CERCETĂRI PRIVIND CINETICA DE DENATURARE A PROTEINELOR DIN ZER

3.1 Introducere.....	56
3.2 Materiale, metode și echipamente utilizate.....	59
3.2.1 Materiale.....	59
3.2.1.1 Lapte.....	59
3.2.1.2 $\beta$ -lactoglobulina.....	59
3.2.2 Metode și echipamente utilizate.....	59
3.2.2.1 Tratamentul termic.....	60
3.2.2.2 Obținerea zerului acid.....	60
3.2.2.3 RP-HPLC.....	60
3.2.2.4 Analiza cinetică de ordinul I.....	62
3.2.2.5 Parametrii termodinamici.....	63
3.2.2.6 Analiza dispersională Anova.....	63
3.3 Rezultate și discuții.....	64
3.3.1 Identificarea proteinelor din zer.....	64
3.3.2 Cuantificarea $\beta$ -LG.....	66
3.3.3 Denaturarea termică.....	67
3.3.3.1 Denaturarea termică a $\beta$ -LG.....	68
3.3.3.2 Denaturarea termică a $\alpha$ -LA.....	73
3.3.4 Parametrii cinetici și termodinamici.....	78
3.4 Concluzii.....	89
3.5 Bibliografie.....	90

### CAPITOLUL 4

#### CERCETĂRI PRIVIND CINETICA DE INACTIVARE A FOSFATAZEI ALCALINE

4.1 Introducere.....	94
4.2 Materiale, metode și echipamente utilizate.....	96
4.2.1 Materiale.....	96
4.2.1.1 Fosfataza alcalină.....	96
4.2.1.2 Lapte.....	96
4.2.2 Metode și echipamente utilizate.....	96

4.2.2.1 Inactivarea termică a enzimei.....	96
4.2.2.2 Determinarea activității enzimatiche.....	97
4.2.2.3 Modelul Weibull.....	98
4.2.2.4 Analiza cinetică de ordinul I.....	99
4.2.3 Prelucrarea statistică a datelor.....	100
4.2.3.1 Programul GinaFit.....	100
4.2.3.2 Analiza de clusterizare ierarhică.....	100
4.3 Rezultate și discuții.....	101
4.3.1 Activitatea enzimatică a fosfatazei alcaline.....	101
4.3.2 Inactivarea termică.....	104
4.3.3 Parametrii cinetici și termodinamici.....	107
4.4 Concluzii.....	121
4.4 Bibliografie.....	122
<b>CAPITOLUL 5</b>	
<b>CERCETĂRI PRIVIND CINETICA DE INACTIVARE A <math>\gamma</math>-GLUTAMIL TRANSFERAZEI</b>	
5.1 Introducere.....	126
5.2 Materiale, metode și echipamente utilizate.....	127
5.2.1 Materiale.....	127
5.2.2 Inactivarea termică a enzimei.....	127
5.2.3 Determinarea activității enzimatiche.....	127
5.2.4 Analiza cinetică a datelor.....	128
5.3 Rezultate și discuții.....	128
5.3.1 Distribuția GT în laptele de capră, oaie și vacă.....	128
5.3.2 Influența grăsimii asupra distribuției GT în lapte.....	130
5.3.3 Inactivarea termică.....	131
5.3.4 Parametrii cinetici și termodinamici.....	137
5.4 Concluzii.....	147
5.5 Bibliografie.....	148
<b>CAPITOLUL 6</b>	
<b>CERCETĂRI PRIVIND CINETICA DE INACTIVARE A LACTOPEROXIDAZEI</b>	
6.1 Introducere.....	151
6.2 Materiale, metode și echipamente utilizate.....	152
6.2.1 Lapte.....	152
6.2.2 Inactivarea termică a enzimei.....	152
6.2.3 Determinarea activității enzimatiche.....	153
6.2.4 Analiza cinetică a datelor.....	153
6.2.5 Prelucrarea statistică a datelor.....	154
6.3 Rezultate și discuții.....	154
6.3.1 Activitatea enzimatică.....	154

6.3.2 Inactivarea termică.....	155
6.3.3 Parametrii cinetici și termodinamici.....	158
6.4 Concluzii.....	167
6.5 Bibliografie.....	168
<b>CAPITOLUL 7</b>	
<b>ANALIZA COMPARATIVĂ A CINETICII DE DENATURARE/INACTIVARE TERMICĂ</b>	
7.1 Analiza comparativă a activității FA, GT și LP în diferite tipuri de lapte.....	171
7.2 Analiza comparativă a cineticii de inactivare și denaturare termică în laptele integral.....	173
7.3 Analiza comparativă a cineticii de inactivare termică enzimatică a FA și GT în laptele degresat.....	178
7.4 Analiza comparativă a cineticii de inactivare termică a enzimelor cu ajutorul PCA.....	179
7.5 Concluzii.....	185
7.6 Bibliografie.....	186
<b>CAPITOLUL 8</b>	
<b>EVALUAREA INOCUITĂȚII MICROBIOLOGICE A LAPTELUI PE BAZA PARAMETRILOR CINETICI SPECIFICI UNOR COMPUȘI DIN LAPTE</b>	
8.1 Introducere.....	187
8.2 Date cinetice referitoare la inactivarea microorganismelor patogene prin tratamentul termic de pasteurizare.....	188
8.3 Fosfataza alcalină și siguranța microbiologică.....	190
8.4 $\gamma$ -glutamil transferaza și siguranța microbiologică.....	190
8.5 Lactoperoxidaza și siguranța microbiologică.....	193
8.6 $\beta$ -lactoglobulina și siguranța microbiologică.....	195
8.7 Indicatorii de timp și temperatură și tratamentele termice aplicate-analiza comparativă.....	197
8.8 Concluzii.....	199
8.9 Bibliografie.....	200
<b>CAPITOLUL 9 CONCLUZII FINALE.....</b>	<b>203</b>
<b>CAPITOLUL 10 CONTRIBUȚII ORIGINALE ȘI PERSPECTIVE DE CONTINUARE A STUDIILOR.....</b>	<b>209</b>
<b>Lista lucrărilor publicate.....</b>	<b>211</b>
<b>Anexa 1 Lista figurilor.....</b>	<b>213</b>
<b>Anexa 2 Lista tabelelor.....</b>	<b>217</b>

---

## Obiectivele științifice ale tezei de doctorat

Laptele reprezintă unul dintre cele mai valoroase alimente naturale, de bază în dieta umană încă din cele mai vechi timpuri. Datorită compoziției în nutrienți, laptele constituie însă un mediu excelent de dezvoltare pentru microorganisme.

Majoritatea produselor lactate disponibile pe piață în prezent sunt obținute din lapte de vacă. Un segment aparte îl reprezintă laptele și produsele lactate din lapte de capră, oaie sau bivoliță. Laptele de capră diferă de laptele de vacă și oaie prin gradul de digestibilitate ridicat, alcalinitatea specifică, capacitatea tampon ridicată, conținutul ridicat de acizi grași cu catenă scurtă, fier, zinc, magneziu și anumite caracteristici terapeutice, ceea ce îl recomandă în nutriția și medicina umană (Slacanac și al., 2010).

O lungă perioadă de timp consumatorii au fost reticenți la laptele de capră datorită mirosului puternic dezagreabil. În condițiile actuale, calitatea laptelui de capră a evoluat considerabil și a fost definită de către Ribeiro și al., (2010) ca, „potențialul laptelui de a tolera un tratament termic și de a deveni un produs care să satisfacă cerințele nutritive, igienice, senzoriale și de sănătate ale consumatorilor”.

Interesul din ce în ce mai mare al consumatorilor spre o alimentație sănătoasă a condus de asemenea și la o creștere a preferințelor acestora față de laptele și produsele lactate obținute din lapte de origine nebovină și, în special, pentru cele obținute din lapte de capră.

La nivelul legislației specifice Uniunii Europene referitoare la calitatea laptelui materie primă și tratat termic nu se fac referiri între proveniența laptelui, deși diferențele compoziționale în anumiți nutrienți și comportamentul termic sunt semnificative între specii.

Marea majoritate a studiilor referitoare la garantarea siguranței în consum a laptelui s-au realizat pe laptele bovin. Într-adevăr, producția de lapte de vacă nu va putea fi niciodată depășită de cea provenită din lapte de oaie și capră, dar, creșterea consumului de produse lactate din lapte de origine nebovină cumulată mai ales cu beneficiile pentru sănătate pe care le conferă astfel de produse, impun definirea unor criterii specifice care să garanteze siguranța în consum a acestora. Aceste criterii trebuie să asigure în egală măsură eficiența tratamentului termic dar și posibilitatea utilizării acestora în managementul calității și siguranței în toate etapele procesului tehnologic.

Pentru a nu pune în pericol sănătatea consumatorului, indiferent de specia de la care provine, laptele trebuie încălzit. Principalele tratamente termice aplicate în industria laptelui sunt reprezentate de termizare, pasteurizare, procesare ultra înaltă (UHT) și sterilizare. În timpul tratamentului termic au loc o serie de modificări ce conduc la scăderea valorii nutriționale a laptelui, concentrația în care se formează acești compuși fiind dependentă de intensitatea tratamentului termic aplicat și de specia de la care provine laptele.

Pentru a evalua eficiența tratamentului termic, se impune cunoașterea detaliată a impactului pe care îl are procesul din punct de vedere calitativ și microbiologic în lapte.

Considerând importanța, beneficiile și potențialul pe care îl prezintă laptele nebovin, prezentul studiu s-a orientat în direcția caracterizării indicatorilor intrinseci de diferențiere a regimurilor de timp și temperatură specifice pasteurizării. Acest lucru s-a realizat prin studii detaliate de cinetică de denaturare a principalelor proteine din zer și inactivare a unor enzime din lapte.



---

Studierea comportamentului termic al proteinelor și enzimelor din laptele nebovin în comparație cu cel bovin a avut în vedere contextul mai larg al valorificării cercetărilor prin obținerea de produse lactate noi de origine caprină și ovină care să prezinte siguranță în consum.

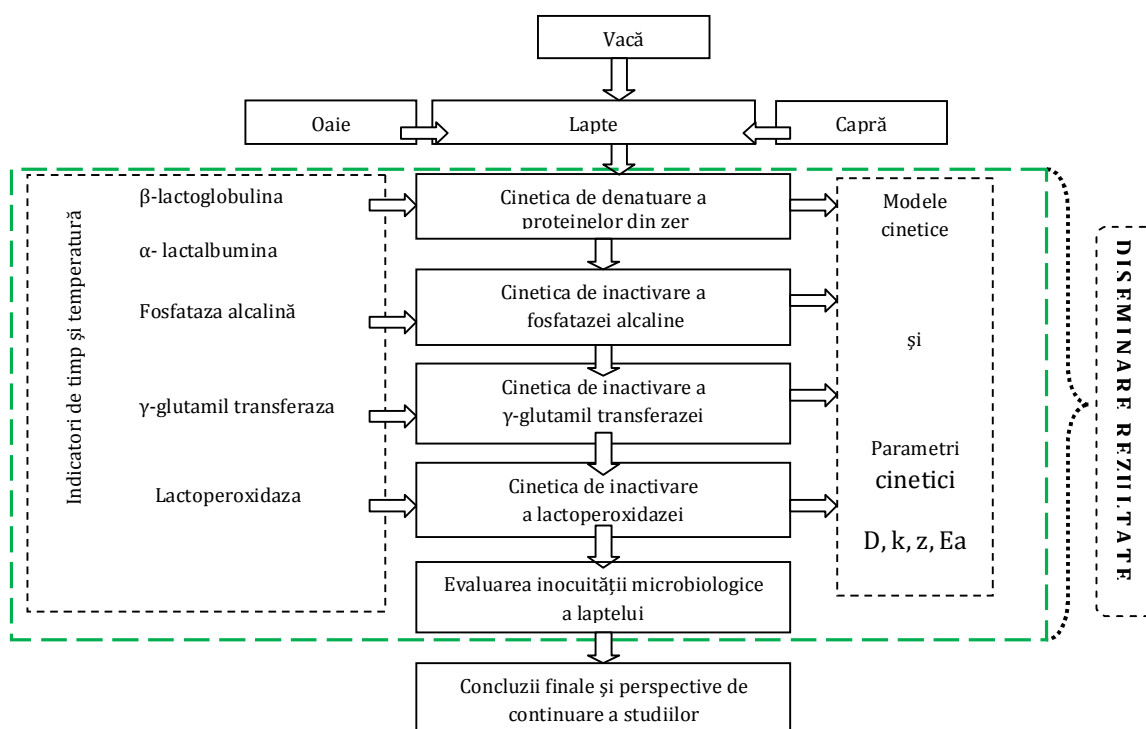
Obiectivele științifice generale ale tezei de doctorat au vizat:

- Fundamentarea științifică a impactului pe care îl are tratamentul termic asupra unor compuși din lapte pe baza unui studiu documentar vast din literatura de specialitate;
- Cunoașterea în detaliu a diferențelor compoziționale între speciile de lapte selectate;
- Selectarea unor indicatori intrinseci adecvați pentru diferențierea tratamentelor termice aplicate în industria laptelui;
- Studii detaliate de cinetică de denaturare/inactivare și caracterizarea mecanismelor de denaturare/inactivare pe baza parametrilor cinetici și termodinamici;
- Evaluarea parțială a conceptului de siguranță alimentară a laptelui provenit de la diferite specii pe baza corelării parametrilor cinetici obținuți cu parametrii de distrugere microbiană a unor microorganisme patogene potențial prezente în lapte;
- Diseminarea rezultatelor prin publicarea de lucrări în reviste per review ISI cu factor de impact.

Din obiectivele generale au fost dezvoltate următoarele obiective specifice ale cercetării:

- Studii de denaturare termică a  $\beta$ -lactoglobulinei și  $\alpha$ -lactalbuminei în laptele de origine caprină, ovină și bovină;
- Analiza comparativă a mecanismelor de denaturare a  $\beta$ -lactoglobulinei și  $\alpha$ -lactalbuminei pe baza unor parametri cinetici;
- Testarea unui nou substrat de determinare a activității fosfatazei alcaline și studierea comportamentului termic de inactivare a enzimei în laptele de capră și oaie în comparație cu laptele de vacă, cu stabilirea eficienței utilizării acestui substrat în industria laptelui;
- Studii de inactivare termică a  $\gamma$ -glutamil transferazei și lactoperoxidazei în laptele de capră și oaie în comparație cu laptele de vacă;
- Evaluarea comparativă a cineticii de inactivare a fosfatazei alcaline și  $\gamma$ -glutamil transferazei în cele trei tipuri de lapte în funcție de conținutul de grăsime;
- Evaluarea inocuității microbiologice a laptelui pe baza parametrilor cinetici specifici unor compuși din lapte;
- Calculul parametrilor cinetici și termodinamici rezultați în urma prelucrării statistice a datelor;
- Analiza comparativă a datelor obținute prin utilizarea a două modele matematice cu rezultate din literatura de specialitate;
- Stabilirea criteriilor de siguranță a laptelui de capră și oaie prin elaborarea diagramelor de timp și temperatură pentru distrugere microbiană ce au la bază parametrii cinetici de denaturare proteică și de inactivare enzimatică;
- Crearea unui tablou comparativ general pe baza studiilor cinetice efectuate asupra  $\beta$ -lactoglobulinei,  $\alpha$ -lactalbuminei, fosfatazei alcaline,  $\gamma$ -glutamil transferazei și lactoperoxidazei.

Metodologia propusă în acest studiu în vederea caracterizării indicatorilor de timp și temperatură pentru tratamentul termic de pasteurizare din laptele de capră și oaie în comparație cu laptele de vacă este prezentată în figura I.



**Figura I** Strategia și etapele cercetării

Teza de doctorat conține 211 pagini, 70 de figuri și 56 de tabele. Studiul documentar este prezentat în 55 pagini, în timp ce partea experimentală este formată din 156 pagini. La elaborarea tezei de doctorat au fost utilizate 229 referințe bibliografice.

**În studiul documentar**, structurat în două capitole (1 și 2), se prezintă date din literatura de specialitate cu referire la compoziția generală a laptelui provenit de la diferite specii de animale, precum și principalele tratamente termice care se aplică în industria laptelui.

Capitolul 1 intitulat *Laptele materie primă- analiza comparativă interspecii* cuprinde date din literatura de specialitate referitoare la principalele componente fizico-chimice din laptele de capră și oaie în comparație cu laptele de vacă. Sunt prezentate în continuare informații generale referitoare la microbiologia laptelui crud, precum și modalități de asigurare a calității laptelui.

În capitolul 2 intitulat *Tratamente termice aplicate în industria laptelui* se prezintă date din literatură referitoare la principalele tratamente termice aplicate în industria laptelui, efectele nedorite pe care le induce tratamentul termic asupra compoziției laptelui precum și metodele de verificare a eficienței tratamentelor termice. Pentru verificarea eficienței tratamentelor termice sunt prezentați și caracterizați principalii indicatori de timp și temperatură, aceștia fiind :  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, fosfataza alcalină,  $\gamma$ -glutamil transferaza și lactoperoxidaza.

**Partea experimentală**, care cuprinde rezultatele cercetărilor efectuate pe parcursul derulării stagiului doctoral, este structurată în șase capitole, după cum urmează :

Capitolul 3 intitulat *Cercetări privind cinetica de denaturare a proteinelor din zer*, descrie materialele și metodele de analiză utilizate pentru denaturarea termică a principalelor două proteine din zer,  $\beta$ -lactoglobulina și  $\alpha$ -lactalbumina din laptele de capră și oaie în comparație cu laptele de vacă,

---

precum și rezultatele obținute în urma studiului efectuat cu o valoare de cercetare fundamentală și aplicativă .

Capitolul 4 intitulat *Cercetări privind cinetica de inactivare a fosfatazei alcaline* prezintă rezultatele investigațiilor ce au urmărit evaluarea influenței tratamentului termic asupra cineticii de inactivare a fosfatazei alcaline din laptele de vacă, oaie și capră prin intermediul a două modele matematice, în prezența unui substrat nou fluorescent. Rezultatele obținute au evidențiat neaplicabilitatea acestui substrat pentru cuantificarea fosfatazei alcaline în laptele pasteurizat.

În capitolul 5 intitulat *Cercetări privind cinetica de inactivare a  $\gamma$ -glutamil transferazei* s-a evidențiat distribuția diferită a enzimei în fracțiunea grasă, precum și activitatea enzimatică diferită în funcție de tipul de lapte analizat. Studiile experimentale realizate prin intermediul a două modele matematice au demonstrat că cinetica de inactivare a enzimei este similară indiferent de conținutul de grăsime sau de specia de la care provine laptele.

Capitolul 6, *Cercetări privind cinetica de inactivare a lactoperoxidazei* a pus în evidență diferențele de activitate semnificative ce există în laptele de capră, oaie și vacă. Din studiile cinetice de inactivare termică a reieșit că lactoperoxidaza din laptele de oaie prezintă termostabilitatea cea mai ridicată.

Capitolul 7 intitulat *Analiza comparativă a cineticii de denaturare/inactivare termică* a încercat să realizeze un studiu comparativ al parametrilor cinetici rezultați în urma studiilor efectuate pe proteinele și enzimele selectate din laptele de capră, oaie și vacă. Analiza de clusterizare ierarhică a pus în evidență tipul de lapte de la care provin enzimele studiate.

În capitolul 8 intitulat *Evaluarea inocuității microbiologice a laptelui pe baza parametrilor cinetici specifici unor compuși din lapte*, s-au construit diagramele de timp și temperatură pentru  $\gamma$ -glutamil transferază, lactoperoxidază și  $\beta$ -lactoglobulină, în vederea garantării siguranței în consum a laptelui de capră, oaie și vacă. și diferențierii severității tratamentului termic aplicat.

Capitolul 9 prezintă concluziile generale pe capitole rezultate în urma studiilor efectuate pe parcursul derulării cercetărilor.

În capitolul 10 sunt prezentate contribuțiile originale și perspectivele de continuare a studiilor.

Diseminarea studiilor întreprinse în cadrul tezei de doctorat a fost realizată prin publicarea a 5 lucrări indexate ISI în reviste științifice internaționale de prestigiu și 3 participări la conferințe din țară și străinătate.

---

## Capitolul 3

### Cercetări privind cinetica de denaturare a proteinelor din zer

#### 3.2 Materiale și metode

##### 3.2.1 Materiale

###### 3.2.1.1 Lapte

Pentru fiecare set de experimente, aproximativ 2,5 litri de lapte proaspăt de capră (25 capete, rasa Albă de Banat), oaie (100 capete, rasa Merinos) și vacă (4 capete rasa Simmental) provenit dintr-un lot de cel puțin 10 litri de lapte a fost obținut, de la fermierii locali din județul Galați în perioada septembrie-octombrie 2011.

###### 3.2.2 Metode și echipamente utilizate

Experimentele preliminare au fost realizate în Laboratorul de Tehnologia Laptelui și a Produselor lactate din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor. Compoziția laptelui referitoare la conținutul de proteine, grăsime, lactoză, substanță uscată negrasă și cenușă, a fost determinată cu ajutorul unui analizor de lapte cu ultrasunete (Milk-Lab Ltd, Odham, Lancashire, UK).

Pentru experimentele realizate, laptele a fost încălzit la 40°C și separat centrifugal cu ajutorul separatorului centrifugal FT 15 (Armfield, Anglia). Conținutul de grăsime din laptele degresat a fost mai mic de 0,1%. Laptele astfel obținut a fost standardizat cu smântână la un conținut de 3,5 % grăsime. Ulterior, probele de lapte au fost păstrate la o temperatură mai mică de -20°C în flacoane din plastic de 10 mL.

###### 3.2.2.1 Tratamentul termic

Tratamentul termic a fost realizat în eprubete din sticlă prin utilizarea a 5 mL de lapte și imersarea lor în baie de apă (Digibath-2 BAD 4, Raypa Trade, Spania) în diferite combinații de temperatură (72,5-90°C) și timpi de menținere (5 secunde-5 minute). Inițial, au fost realizate teste preliminare pentru a stabili intervalul de timp necesar pentru a se atinge temperatura dorită. Pentru a evita o ulterioară denaturare, imediat după tratamentul termic probele au fost introduse în baie de gheață.

###### 3.2.2.2 Obținerea zerului acid

Probele tratate termic au fost apoi diluate cu aceeași cantitate de apă ultrapură. Precipitarea proteinelor din zer a fost realizată prin adăugarea a 200 μL acid acetic de concentrație 33%. După o perioadă de repaos de 10 minute, pH-ul probelor a fost ajustat la valoarea de 4,5 utilizând CH<sub>3</sub>COONa de concentrație 3,3 M. Precipitatul a fost îndepărtat prin centrifugare la 10000 rpm timp de 10 minute la 4°C. Supernatantul astfel obținut a fost filtrat prin folosirea unor filtre cu grosimea de 0,45 μm (Milipore Corporation, USA) și păstrat la temperatura de -23°C până în momentul utilizării. Procedura de lucru este prezentată și în figura 3.1.

###### 3.2.2.3 RP HPLC (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography)

Identificarea și cuantificarea proteinelor din zerul acid a fost realizată cu ajutorul cromatografiei de lichide de înaltă performanță de fază inversă. Echipamentul HPLC (figura 3.2) este format dintr-o pompă Waters 600 E (Waters 996), sistem de detecție cu fotodiode (Waters 996), degazor cu heliu, injector Rheodyne (model 7125) și software Millennium v. 3.05.01 (Waters). Pentru separare s-a folosit o

---

coloană Vydac C4 214 TP 5415 (Separations Group, Hesperia, CA, USA). Viteza de curgere a fost setată la 1mL/min. Ca solvent A s-a utilizat acidul trifluoracetic (TFA) de concentrație 0,1% , solventul B utilizat a fost 0,1% TFA și 80% acetonitril.

Procentul de solvent B schimbat în amestecul de eluție a fost următorul: 0-15 min, 27-40% B; 15-55 minute, 40-56% B; 55-57 minute, 56-80% B; 57-60 minute, 80% B; 60-62 minute, 80-27% B. Apoi, coloana a fost reechilibrată prin eluție isocratică cu 27% solvent B timp de 13 minute. Probele au fost diluate cu solvent A (concentrația de proteină fiind de 0,15g/100g) 50 μL de probă fiind utilizate în experimente. Toate determinările au fost efectuate în triplicat.

#### 3.2.2.4 Analiza cinetică de ordinul întâi

Cinetica de denaturare a proteinelor din zer a fost descrisă cu ajutorul unei ecuații de ordinul I (relația 3.1.). Valorile constantelor vitezei de denaturare termică ( $k$ ) au fost calculate din panta ecuației de regresie liniară obținută prin reprezentarea grafică a logaritmului natural al concentrației reziduale relative ( $C$  și respectiv  $C_0$ ) în funcție de timpul de denaturare ( $t$ ) în secunde sau minute.

$$\ln \frac{C}{C_0} = -kt, \quad (3.1.)$$

unde,  $k$  reprezintă constanta vitezei de denaturare.

În continuare, au fost estimați următorii parametri cinetici:

- Timpul necesar pentru reducerea cu 90 % a concentrației inițiale de proteină exprimat prin valoarea  $D$ ;

În modelul global, legătura dintre  $D$  și  $k$  este dată de relația 3.2. :

$$D = \frac{\ln(10)}{k} = \frac{2.303}{k} \quad (3.2)$$

- Temperatura necesară pentru reducerea de 10 ori a valorii  $D$ , exprimată prin valoarea lui  $z$  ;

Dependența de temperatură a constantelor vitezei de denaturare a fost estimată cu ajutorul modelului Arrhenius (relația 3.3.):

$$\ln(k) = \ln(k_0) + \left[ \frac{E_a}{R} \cdot \left( \frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right) \right] \quad (3.3.) \text{ în care:}$$

- ✓  $T$  și  $T_0$  reprezintă temperatura absolută și de referință (K);
- ✓  $k_0$  este constanta vitezei de inactivare la  $T_0$ ;
- ✓  $E_a$  reprezintă energia de activare (kJ/mol);
- ✓  $R$  reprezintă constanta universală a gazelor (8,314 J/mol/K).

#### 3.2.2.6 Analiza dispersională - Anova

Procedeele de analiză dispersională constă în analiza variației unei variabile în raport cu factorii de influență. Acest procedeu permite testarea unor ipoteze statistice referitoare la parametrii unui model pentru a verifica dacă există diferențe semnificative între acestea. Analiza varianței permite, de asemenea, estimarea componentelor dispersiei unei variabile și verificarea semnificației factorilor de influență.

Anova unifactorială este un procedeu de analiză a variației pentru un singur factor cauză, în timp ce Anova bifactorială analizează variabila pe surse de variație în raport cu doi factori cauză.

### 3.3. Rezultate și discuții

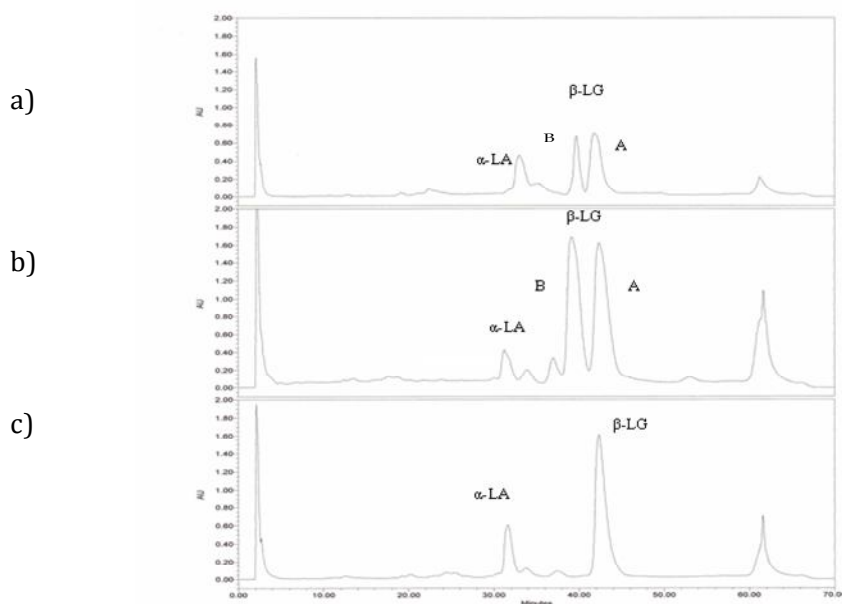
#### 3.3.1 Identificarea principalelor proteine din zer

Identificarea principalelor proteine din zer în laptele provenit de la diferite specii a fost realizată prin RP-HPLC, metodă cunoscută pentru precizia cu care realizează separarea fracțiunilor proteice, printr-o metodă dezvoltată de [Moatsou și al., \(2005\)](#). În figura 3.3 sunt reprezentate cele trei cromatograme pentru lapte de vacă (a), lapte de oaie (b) și lapte de capră (c). Din figură se pot observa cu ușurință diferențele care apar în funcție de specia de la care provine laptele, în special pentru  $\beta$ -LG.

Profilul  $\alpha$ -LA a fost variabil, în toate tipurile de lapte fiind identificată o singură variantă genetică. Din figura 3.3 se poate observa că proteinele din zer de origine ovină sunt caracterizate printr-un conținut scăzut de  $\alpha$ -LA, în comparație cu cele de origine caprină și bovină. Se poate de asemenea evidenția forma diferită a peak-ului aferent  $\alpha$ -LA de origine ovină în comparație cu cel de origine bovină și caprină.

#### 3.3.2 Cuantificarea proteinelor din zer

Concentrațiile calculate pentru  $\beta$ -LG au fost de 3,12 mg/mL în laptele de vacă, 3,33 mg/mL în laptele de capră și 7,90 mg/mL în laptele de oaie.

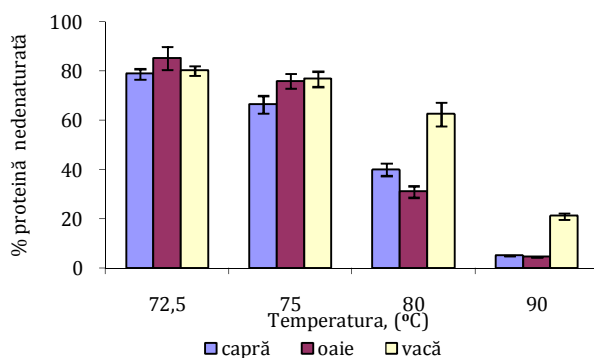


**Figura 3.3** Cromatogramele RP-HPLC obținute pentru  $\alpha$ -LA și  $\beta$ -LG din lapte de vacă (a), oaie (b) și capră (c)

#### 3.3.3 Denaturarea termică

În cadrul acestui experiment, au fost determinate concentrațiile de proteină nendenaturată, calculați și comparați parametrii cinetici și termodinamici. Au fost evaluate de asemenea mecanismele de denaturare pentru cele două proteine analizate.

În figura 3.9 sunt prezentate concentrațiile procentuale de  $\beta$ -LG nedenaturată în diferite tipuri de lapte la timp constant (1 minut) și temperatură de denaturare diferită. La temperatura de 75°C, procentul de proteină nedenaturată a fost de 66,47±3,56%, 75,93±2,98% și 76,77±3,12% în lapte de capră, oaie și vacă. Procentul de  $\beta$ -LG nedenaturată după menținerea timp de 1 minut la temperatura de 90°C a fost 5,05±0,12% (lapte de capră), 4,56±0,06% (lapte de oaie) și 21,1±1,3% (lapte de vacă). Se poate aprecia astfel că, termostabilitatea cea mai ridicată după 1 minut de tratament termic o prezintă  $\beta$ -LG de origine bovină.

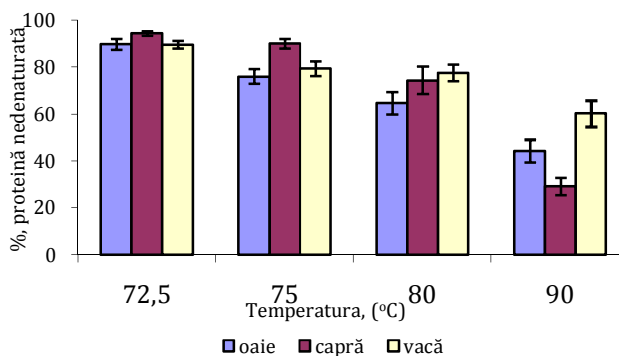


**Figura 3.9** Concentrația procentuală de  $\beta$ -LG nedenaturată după 1 minut de menținere la diferite temperaturi

Gradul redus de denaturare în domeniul de temperatură 72,5-75°C se datorează reactivității suficient de mare a grupărilor SH libere ce sunt implicate în interacțiuni intramoleculare în detrimentul celor intermoleculare. Creșterea gradului de denaturare în urma aplicării unei temperaturi mai mari de 80°C se explică prin agregarea moleculelor ce conduce totodată la scăderea solubilității proteinei (Stănciuc, 2009).

### 3.3.3.2 Denaturarea termică a $\alpha$ -LA

Din figura 3.10 se poate observa că menținerea probelor de lapte timp de un minut la temperaturi cuprinse în intervalul 72,5-80°C a condus la un grad redus de denaturare a  $\alpha$ -LA, cuprins între cca. 10% pentru laptele de oaie și de vacă și cca. 5,5% în laptele de capră. Aplicarea unei temperaturi de 90°C a condus la creșterea gradului de denaturare, cel mai mic procent de  $\alpha$ -LA nedenaturată a fost obținut în laptele de capră (29,19±3,61%) iar cel mai ridicat în laptele de vacă (60,23±5,6%).



**Figura 3.10.** Concentrația procentuală de  $\alpha$ -LA nedenaturată după 1 minut de tratament termic

Analizând comparativ cele două proteine pe baza tabelelor 3.2, 3.3, și figurilor 3.9., 3.10. se poate aprecia că  $\alpha$ -LA prezintă o mai mare stabilitate termică în comparație cu  $\beta$ -LG. În intervalul de temperatură 80-90°C, cel mai mic grad de denaturare pentru ambele proteine studiate a fost întâlnit în laptele de vacă. La temperatura de 80°C,  $\alpha$ -LA din laptele de oaie este mai termostabilă decât cea din laptele de capră, în timp ce,  $\beta$ -LG din laptele de capră a prezentat un grad mai redus de denaturare în comparație cu cea de origine ovină.

### 3.3.4 Parametrii cinetici și termodinamici

În tabelul 3.4 (a) sunt centralizate valorile estimate ale timpului de reducere decimală ( $D$ ) și ale factorului  $z$ . Așa cum era de așteptat, timpul de reducere decimală scade cu creșterea temperaturii. Din analiza comparativă se observă că la temperatura de 72,5°C,  $D$  prezintă valori similare în laptele de vacă și oaie, în timp ce pentru laptele de capră se înregistrează o valoare de 7,86±0,56 minute. Astfel, în laptele de capră, timpul necesar reducerii concentrației de  $\beta$ -LG native cu 90% este de aproximativ două ori mai mic față de celelalte tipuri de lapte analizate. La temperatura de 90°C, comparativ cu laptele de vacă, laptele de capră a prezentat o valoare de aproximativ cinci ori mai mică pentru  $D$ .

**Tabel 3.4** Valorile pentru timpul de reducere decimală ( $D$ ) și temperatura necesară reducerii de 10 ori a valorii  $D$  ( $z$ ) pentru  $\beta$ -LG (a) și  $\alpha$ -LA (b) în laptele de capră, oaie și vacă

a)

Temperatura (°C)	Lapte de capră		Lapte de oaie		Lapte de vacă	
	D (min)	R <sup>2</sup>	D (min)	R <sup>2</sup>	D (min)	R <sup>2</sup>
72,5	7,86±0,56	0,94	15,64±0,8	0,92	14,74±0,9	0,94
75	2,55±0,06	0,96	10,09±0,12	0,98	12,56±0,01	0,96
80	1,22±0,18	0,92	2,0±0,15	0,94	3,37±0,21	0,97
90	0,22±0,001	0,94	0,35±0,07	0,92	1,13±0,03	0,98
<b>z (°C)</b>	<b>12,13 ± 1,24</b>		<b>10,47 ± 0,09</b>		<b>15,06 ± 1,27</b>	

b)

Temperatura (°C)	Lapte de capră		Lapte de oaie		Lapte de vacă	
	D (min)	R <sup>2</sup>	D (min)	R <sup>2</sup>	D (min)	R <sup>2</sup>
72,5	63,79±5,56	0,99	33,91±3,07	0,96	52,82±4,9	0,92
75	46,06±5,06	0,96	30,06±2,95	0,92	37,75±4,51	0,93
80	21,01±2,78	0,94	11,36±2,45	0,95	13,10±2,21	0,97
90	2,22±0,15	0,90	2,77±0,5	0,97	5,16±1,9	0,93
<b>z (°C)</b>	<b>11,84 ± 0,24</b>		<b>15,45 ± 1,09</b>		<b>17,15 ± 1,17</b>	

În ceea ce privește parametrii cinetici de denaturare ai  $\alpha$ -LA, din tabelul 3.4. (b) se poate observa că la temperatura de 72,5°C, cea mai ridicată valoare pentru  $D$  a fost înregistrată în laptele de capră, și anume 63,79± 5,56 minute, în timp ce valoarea cea mai scăzută a fost înregistrată în laptele de oaie cu 33,91±3,07 minute. Valorile lui  $D$  obținute la 75°C față de 72,5°C sunt mai mici cu 28,8% în laptele de capră, cu 11,35 % în laptele de oaie și cu 28,5 % în laptele de vacă. La temperatura de 90°C, se poate observa că valoarea lui  $D$  este similară în laptele de capră și oaie, valoare ce este mai mică de aproximativ 2,3 ori față de cea calculată în laptele de vacă.

Valorile calculate pentru energia de activare ( $Ea$ ) a  $\beta$ -LG au fost de 198,49±2,84 kJ/mol în laptele de capră, 229,92±6,58 kJ/mol în laptele de oaie și 160,00±5,14 kJ/mol în laptele de vacă. În laptele de



---

vacă, ca urmare a valorii scăzute obținute pentru  $E_a$ , este necesară o energie mult mai redusă pentru a rupe legăturile proteice interne.

Pentru  $\alpha$ -LA au fost calculate următoarele valori:  $202,65 \pm 1,42$  kJ/mol (lapte de capră),  $155,56 \pm 5,53$  kJ/mol (lapte de oaie) și  $140,44 \pm 6,14$  kJ/mol (lapte de vacă). Se poate observa că în laptele de capră valorile calculate pentru  $E_a$  corespunzătoare celor două proteine sunt similare, în timp ce în laptele de vacă și oaie, valorile  $E_a$  sunt mai mari pentru  $\beta$ -LG.

Pentru industria laptelui, mecanismul de denaturare a proteinelor din zer prezintă o importanță deosebită, deoarece interacțiunile induse de tratamentul termic dintre moleculele proteice (cele mai importante fiind cele cu  $k$ -cazeina) pot afecta semnificativ o serie de proprietăți tehnologice importante ale laptelui, cum ar fi de exemplu capacitatea de coagulare, structura, reologia și proprietățile de sinereză ale gelurilor (incluzând iaurtul, brânza proaspătă sau brânzeturile coagulate enzimatic) și, de asemenea, stabilitatea termică a laptelui și a produselor concentrate, prevenindu-se precipitarea proteinelor.

### 3.4 Concluzii

Cercetările privind cinetica de denaturare a proteinelor din zer prezentate în capitolul 3 au avut ca obiectiv principal studiul cinetic al denaturării termice a  $\beta$ -LG și  $\alpha$ -LA din laptele de oaie și capră în comparație cu laptele de vacă, cu scopul de a stabili aplicabilitatea proteinelor de origine nebovină de a fi utilizate pentru diferențierea tratamentelor termice de pasteurizare alături de cea de origine bovină. Concluziile studiului sunt următoarele:

- Concentrația cea mai ridicată de  $\beta$ -LG a fost identificată în laptele de oaie, urmată de laptele de capră și vacă;
- Cinetica de denaturare termică a fost studiată pentru prima dată în condiții similare în laptele de capră, oaie și vacă;
- Gradul de denaturare al ambelor proteine este neglijabil în domeniul regimului de pasteurizare joasă, dar mult mai pronunțat în intervalul de temperatură corespunzător pasteurizării înalte. Aceste informații pot fi deosebit de utile atunci când proteina este utilizată ca indicator al intensității tratamentului termic aplicat laptelui sau se dorește gelifierea  $\beta$ -LG în diferite sisteme alimentare;
- La temperatura de  $72,5^\circ\text{C}$ ,  $\beta$ -LG din laptele de oaie este mult mai stabilă față de cea din laptele de capră și vacă. Același regim de lucru aplicat a condus la un grad redus de denaturare asupra  $\alpha$ -LA din laptele de capră, spre deosebire de laptele de vacă și oaie;
- Intervalul de temperatură  $80-90^\circ\text{C}$  a avut un efect mai redus asupra denaturării  $\beta$ -LG în laptele de vacă în comparație cu cea din laptele de capră și oaie;
- Față de  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA a fost mult mai termostabilă în experimentele efectuate;
- Analiza Anova bifactorială pentru un prag de semnificație  $\alpha=0,05$  arată că pentru condițiile de lucru analizate, constantele vitezei de denaturare a  $\beta$ -LG și  $\alpha$ -LA sunt influențate semnificativ doar de temperatură și nu de tipul de lapte de la care provin proteinele;
- Valorile calculate pentru energia de activare sunt similare la ambele proteine în laptele de capră, în timp ce pentru laptele de oaie și vacă energia de activare este mai mare pentru  $\beta$ -LG și mai mică pentru  $\alpha$ -LA ;

---

În concluzie, aplicabilitatea  $\beta$ -LG ca indicator al tratamentului termic este influențată de conținutul variabil pe care îl prezintă aceasta în funcție de tipul de lapte analizat. Astfel concentrația stabilită pentru  $\beta$ -LG de Comisia Europeană în laptele de vacă pasteurizat nu este aplicabilă pentru laptele de origine ovină și caprină. În ceea ce privește  $\alpha$ -LA, aceasta poate fi utilizată alături de  $\beta$ -LG ca indicator de diferențiere a tratamentului termic de pasteurizare în toate tipurile de lapte analizate.

## **Capitolul 4**

### **Cercetări privind cinetica de inactivare termică a fosfatazei alcaline**

#### **4.2. Materiale, metode și echipamente utilizate**

##### **4.2.1 Materiale**

###### **4.2.1.1 Fosfatasa alcalină**

FA (EC 3.1.3.1, provenită din mucoasa intestinală bovină, 120 U/mg) și 8-chinolil-fosfatul (QP) au fost achiziționate de la firma Sigma Aldrich. Toți ceilalți reactivi utilizați au avut puritate analitică. Pentru prepararea tuturor soluțiilor s-a utilizat apă distilată ultrapură.

###### **4.2.1.2 Lapte**

Probele de lapte au fost obținute conform metodologiei descrise în **Capitolul 3 Subcapitolul 3.2.1.**, cu deosebirea că laptele a fost achiziționat în perioada februarie-aprilie 2011. Determinările efectuate au fost realizate atât pe lapte integral cât și degresat.

#### **4.2.2 Metode și echipamente utilizate**

Probele de lapte au fost analizate conform metodologiei prezentate în **Capitolul 3, Subcapitolul 3.2.2.**

##### **4.2.2.1 Inactivarea termică a enzimei**

Capilarele din sticlă (100 mm lungime, diametru interior 1 mm, grosime perete 0,15 mm) au fost umplute cu lapte, sigilate la capete pe flacără de gaz și introduse în baie de apă (Digibath-2 BAD 4, Raypa Trade, Spania). Au fost testate mai multe combinații de temperatură (60-72,5°C) și timp de menținere (0-40 minute). Imediat după tratamentul termic, capilarele au fost răcite pe baie de gheață. Fiecare set de experimente a fost repetat de 3 ori.

##### **4.2.2.2. Determinarea activității enzimice**

Determinarea activității FA a fost determinată spectrofluorimetric folosind ca substrat 8-chinolil-fosfat. Intensitatea fluorescenței este invers proporțională cu activitatea enzimatică, astfel, cu cât concentrația de enzimă este mai mare cu atât intensitatea fluorescenței scade.

Raportul de diluție stabilit pentru fiecare tip de lapte a fost utilizat în scopul citirii cu acuratețe a activității enzimice relative. Amestecul enzimă-substrat obținut a fost termostatat timp de 30 de minute la 37°C.

Măsurarea fluorescenței a fost realizată cu ajutorul spectrofluorimetrului Perkin Elmer LS 155, la lungimile de undă la excitație și emisie ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) de 318 nm și respectiv 495 nm. Proba martor utilizată în măsurătorile experimentale a fost formată din substrat și 0,3 mL lapte tratat termic la 95°C, timp de 1 minut, luându-se în considerare în acest mod o inactivare completă a FA.

---

Curba de calibrare a fost obținută cu o serie de soluții diluate (0,4 – 80 U/L) de FA pură. Activitatea enzimatică a FA a fost apreciată prin scăderea intensității fluorescenței obținută în timpul reacției enzimatică (relația 4.1.):

$$\Delta F = F_0 - F \quad (4.1.)$$

unde,  $F_0$  și  $F$  reprezintă intensitatea fluorescenței sistemului fără și respectiv cu enzimă.

Activitatea reziduală a enzimei a fost calculată cu ajutorul relației 4.2.:

$$\text{Activitate reziduală (\%)} = \frac{A}{A_0} \times 100 \quad (4.2.)$$

unde:  $A$  și  $A_0$  reprezintă activitatea enzimatică a probei tratate termic și respectiv a probei netratate termic.

#### 4.2.2.3 Modelul Weibull

În ultimii ani, modelarea cineticii de inactivare termică prin intermediul ecuației cinetice de ordinul I a reprezentat subiectul mai multor studii de cercetare (Manas și Pagan, 2005). Van Boekel (2002) a sugerat deviații de la comportamentul liniar asigurat de modelul cinetic de ordinul I.

Peleg și Coleg (2000) au stabilit că influența timpului de menținere la o anumită temperatură asupra populației enzimatică este variabilă de la o moleculă la alta și astfel rezistența termică este guvernată de distribuția Weibull (relația 4.3) (Mafart și al., 2002):

$$\log \frac{A}{A_0} = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (4.3)$$

în care:

- ✓  $A$  reprezintă activitatea enzimatică în proba tratată termic;
- ✓  $A_0$  reprezintă activitatea enzimatică în laptele crud;
- ✓  $p$  reprezintă factorul de formă;
- ✓  $\delta$  este sinonim cu timpul de reducere decimală  $D$ , și reprezintă factorul de scală, ce se exprimă în minute sau secunde;

#### 4.2.2.4 Analiza cinetică de ordinul I

Cinetica de inactivare a FA a fost descrisă cu ajutorul unei ecuații de ordinul I. Valorile constantelor vitezei de inactivare termică ( $k$ ) au fost calculate din panta ecuației de regresie liniară obținută prin reprezentarea grafică a logaritmului natural al activității reziduale relative în funcție de timpul de inactivare ( $t$ ).

Legătura dintre  $D$  și  $k$ , precum și dependența de temperatură a constantelor vitezei de inactivare au fost realizate conform principiului descris în **Capitolul 3 Subcapitolul 3.2.2.4**

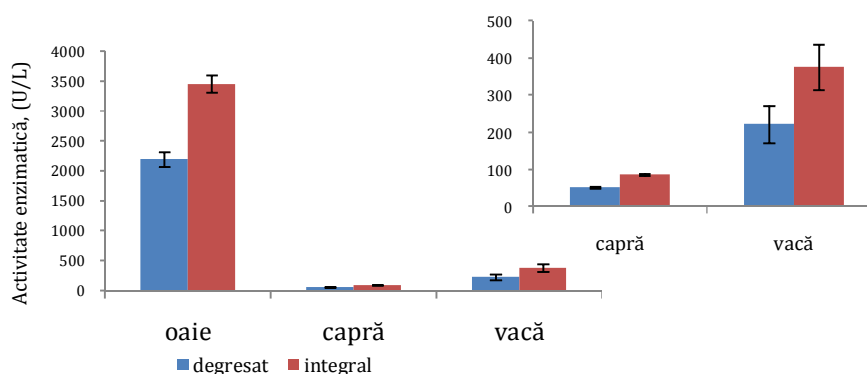
### 4.3 Rezultate și discuții

#### 4.3.1 Activitatea enzimatică a FA

În figura 4.2. este redată activitatea enzimatică medie corespunzătoare FA în laptele de oaie, capră și vacă. Se poate observa faptul că activitatea enzimatică variază semnificativ între specii. Activitatea FA

corespunzătoare laptelui integral a fost de  $3458,4 \pm 145,9$  U/L (lapte de oaie),  $376,01 \pm 61,5$  U/L (lapte de vacă) și respectiv  $86,74 \pm 2,9$  U/L (lapte de capră).

În laptele degresat au fost obținute următoarele valori pentru activitatea enzimatică:  $2191 \pm 123,5$  U/L (lapte de oaie),  $222,7 \pm 49,8$  U/L (lapte de vacă),  $52,4 \pm 2,1$  U/L (lapte de capră). Laptele degresat prezintă  $63,36 \pm 3,3\%$  (lapte de oaie),  $59,24 \pm 2,13\%$  (lapte de vacă) și  $60,47 \pm 1,18\%$  (lapte de capră) din activitatea enzimatică prezentă în laptele integral.



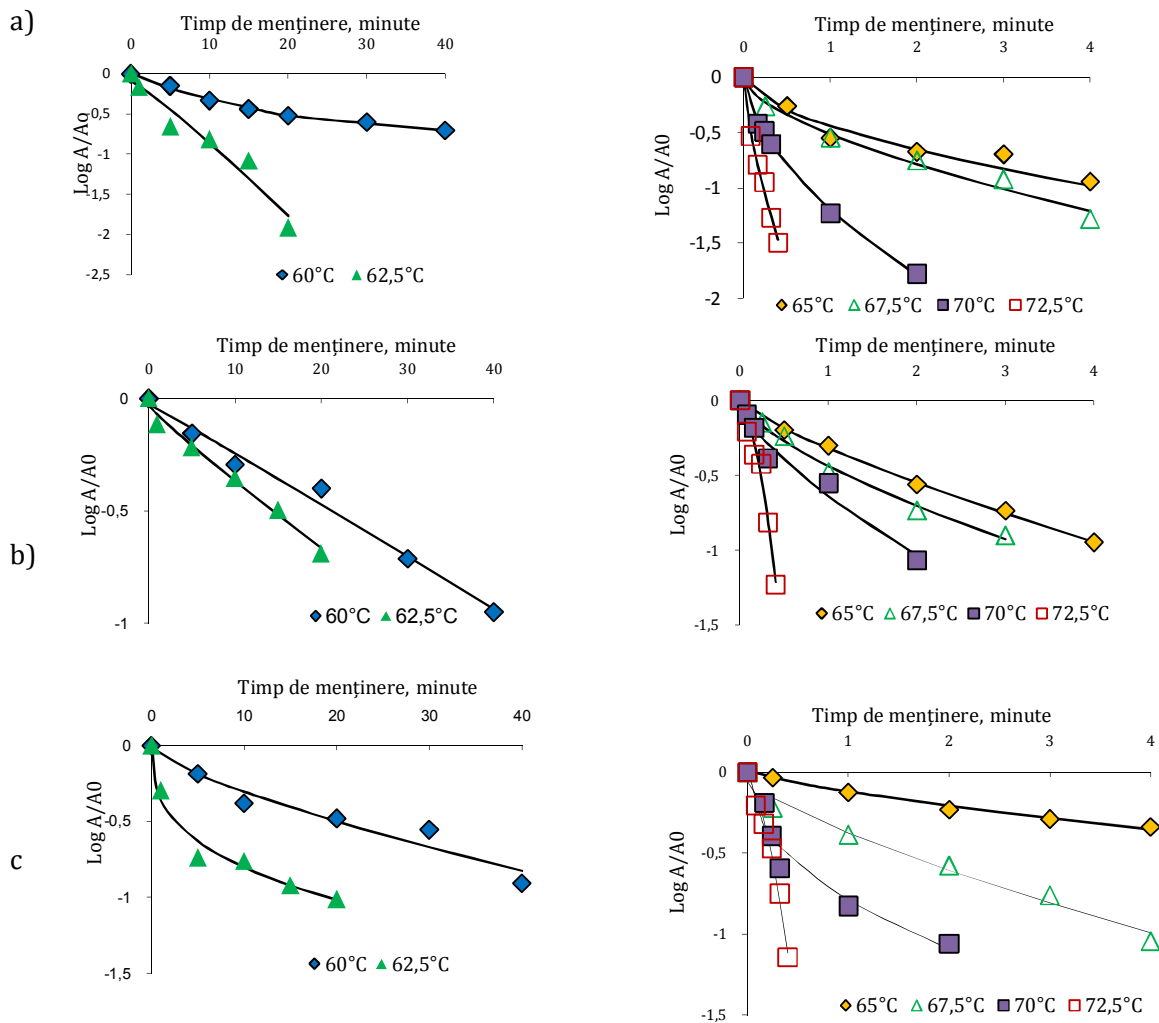
**Figura 4.2** Activitatea enzimatică a FA în cele trei tipuri de lapte

Distribuția activității FA obținută în acest studiu este similară cu cea raportată în literatură, unde aproximativ 30-40% din activitatea acesteia este situată în membrana globulei de grăsime. Modul de distribuție a FA în lapte poate explica diferențele de activitate ce apar atât în laptele integral și degresat. Astfel, FA din laptele de vacă conține 2 izoenzime majore,  $\alpha$ - și  $\beta$ - fosfataza care sunt distribuite în plasma și respectiv membrana globulei de grăsime. B- fosfataza nu este îndepărtată prin centrifugare și este un dimer format din 2 subunități similare cu masa moleculară de aproximativ 85kDa.

Spre deosebire de laptele de oaie, FA se regăsește într-o cantitate mai mică în laptele de vacă și capră, iar în comparație cu laptele de vacă, FA este prezentă într-o cantitate mai mică în laptele de capră. În acest studiu, laptele integral de capră prezintă 2,5% din activitatea prezentă în laptele de oaie și 23,1% din activitatea enzimatică determinată în laptele de vacă.

#### 4.3.3 Parametrii cinetici și termodinamici

În figura 4.6. sunt prezentate curbele de inactivare pentru FA din laptele integral de oaie (a), capră (b) și vacă (c) obținute cu ajutorul modelului Weibull. Ținând cont de scala diferită referitoare la abscisă, pentru a facilita percepția rezultatelor, s-a decis reprezentarea în două grafice corespunzătoare celor două intervale de temperatură.



**Figura 4.6.** Inactivarea termică a FA conform modelului Weibull în **lapte integral** de a) oaie, b) capră și c) vacă la diferite temperaturi

În tabelul 4.4 sunt prezentate comparativ parametrii cinetici aferenți modelului Weibull și cinetic de ordinul I în laptele integral provenit de la diferite specii de animale.

După cum se poate observa (tabelul 4.4.), factorii de formă  $p$  și de scală  $\delta$  sunt dependenți de temperatura aplicată și de tipul de lapte analizat. Concavitățile descendente ( $p > 1$ ) indică faptul că moleculele enzimaticice rămase prezintă termolabilitate ridicată, în timp ce concavitățile ascendente indică capacitatea moleculelor enzimaticice rămase de a se adapta la condițiile de stres aplicate (van Boekel, 2002).

**Tabel 4.4.** Analiza comparativă a parametrilor cinetici de distribuție Weibull și modelului liniar de ordinul I în lapte integral de a) capră, b) oaie și c) vacă la diferite temperaturi

a)

Temperatura (°C)	Lapte de oaie integral					
	$p^1$	Weibull $\delta^2$ min	$R^2$	$D^3$ min	Liniar $kx10^{-2}$ min <sup>-1</sup>	$R^2$
60	0,74±0,06	47,83±2,88	0,994	44,28±3,21	5,20±0,41	0,908
62,5	1,12±0,39	12,59±1,60	0,946	14,57±1,28	15,80±1,2	0,945
65	0,59±0,14	4,20±0,43	0,958	4,83±0,54	47,68±3,41	0,919
67,5	0,63±0,12	3,06±0,14	0,984	4,69±0,18	49,10±4,12	0,958
70	0,58±0,02	0,73±0,04	0,998	0,89±0,09	258,78±13,85	0,945
72,5	0,69±0,08	0,23±0,02	0,993	0,25±0,01	922,20±64,12	0,969
z, (°C)		5,67±0,09			5,87±0,07	

b)

Temperatura (°C)	Lapte de capră integral					
	$p^1$	Weibull $\delta^2$ min	$R^2$	$D^3$ min	Liniar $kx10^{-2}$ min <sup>-1</sup>	$R^2$
60	1,03± 0,18	43,76±2,97	0,985	44,28±2,45	5,20±0,39	0,985
62,5	0,91±0,15	32,94±1,47	0,986	30,30±1,92	7,60±0,54	0,975
65	0,79±0,04	4,32±0,12	0,998	6,79±0,45	33,91±1,52	0,988
67,5	0,66±0,07	3,29±0,25	0,992	3,24±0,12	71,08±5,98	0,959
70	0,70±0,15	1,92±0,26	0,976	1,89±0,09	121,85±10,12	0,961
72,5	1,86±0,44	0,37±0,02	0,973	0,32±0,02	719,68±65,37	0,929
z, (°C)		6,18 ± 0,004			5,97 ± 0,12	

c)

Temperatura (°C)	Lapte de vacă integral					
	$p^1$	Weibull $\delta^2$ min	$R^2$	$D^3$ min	Liniar $k^4x10^{-2}$ min <sup>-1</sup>	$R^2$
60	0,74±0,23	53,07±3,21	0,946	42,64±3,97	5,40±0,34	0,935
62,5	0,34±0,07	18,51±1,85	0,977	22,80±1,98	10,10±0,67	0,800
65	0,75±0,15	15,40±1,23	0,977	12,79±0,52	18,00±0,9	0,959
67,5	0,74±0,14	4,24±0,34	0,984	4,27±0,15	53,93±4,21	0,926
70	0,46±0,12	1,58±0,51	0,945	1,88±0,03	122,50±8,54	0,878
72,5	1,67±0,30	0,39±0,02	0,983	0,85±0,01	270,94±10,34	0,951
z, (°C)		6,05 ± 0,21			7,15 ± 0,15	

<sup>1</sup>-factor de formă, <sup>2</sup>-factor de scală, <sup>3</sup>-timp de reducere decimă, <sup>4</sup>-constanta vitezei de inactivare

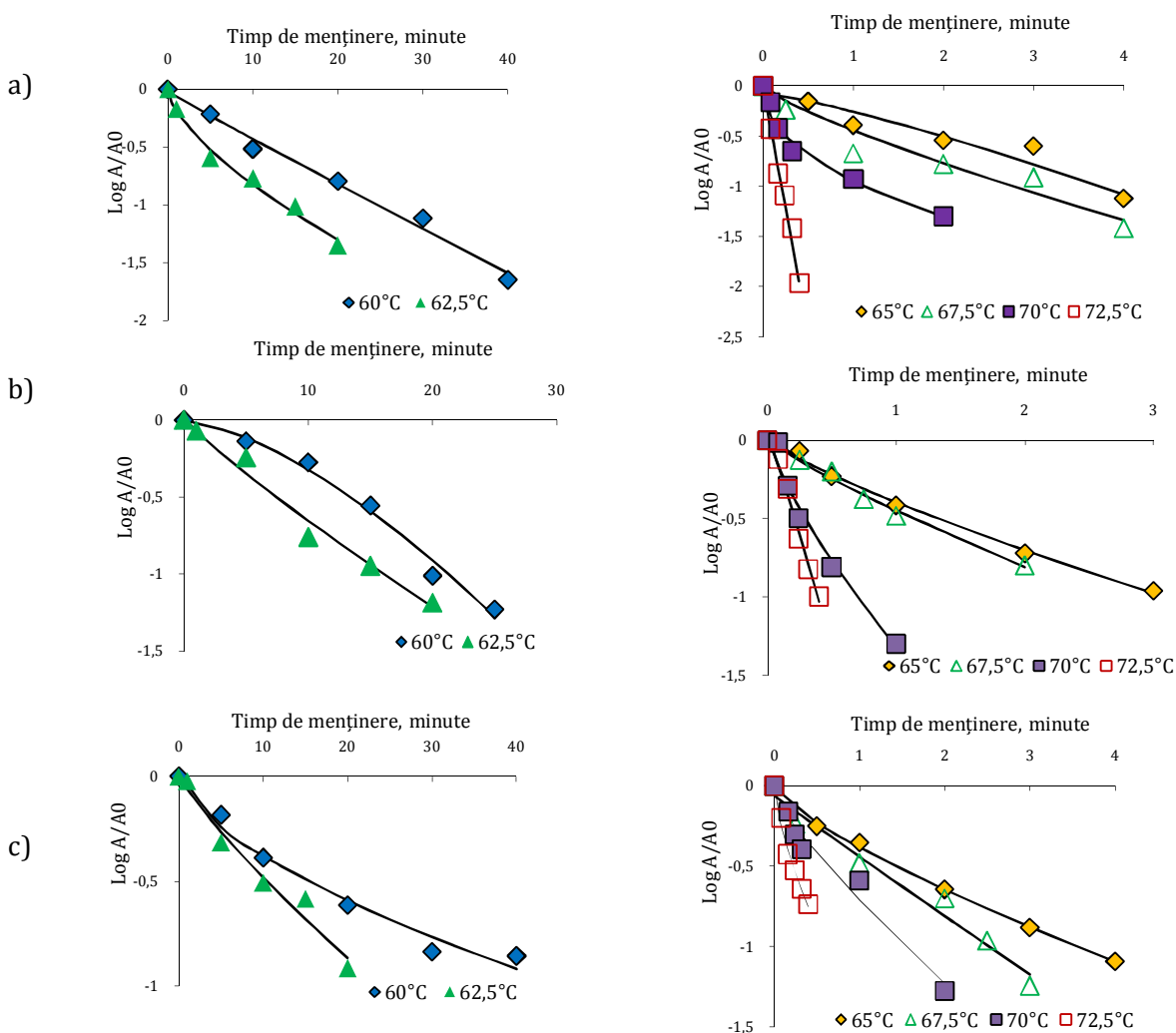
Valorile obținute pentru coeficientul  $D$  sunt în majoritatea cazurilor mai mari spre deosebire de cele ale parametrului  $\delta$ . Acest lucru ar fi indicat o supra-procesare dacă ar fi fost utilizat doar modelul cinetic de ordinul I. În cazul în care valoarea lui  $\delta$  este mai mare decât valoarea lui  $D$ , acest lucru denotă o sub-procesare (Pilavtepe M., 2007).

Valorile calculate pentru factorul  $z$  conform modelelor Weibull și liniar în intervalul de temperatură 60-72,5°C pentru laptele integral au fost următoarele: 6,18±0,004°C și 5,98±0,12°C (lapte de capră), 5,67±0,09°C și 5,91±0,07°C (lapte de oaie) și 6,05±0,21°C și 7,15±0,15°C (lapte de vacă).

În figura 4.7 sunt prezentate curbele de inactivare pentru FA din laptele degresat de oaie (a), capră (b) și vacă (c) obținute prin intermediul modelului Weibull.

În laptele degresat și tratat termic la 60°C, FA se inactivează mult mai rapid în laptele de oaie, în timp ce în laptele de capră și vacă panta dreptelor de regresie a prezentat aceeași valoare.

Spre deosebire de laptele de capră integral, în intervalul de temperatură 60-70°C, procesul de inactivare al FA din laptele de capră degresat se realizează mult mai rapid. Comparativ cu laptele integral, în laptele degresat de oaie și de vacă, FA se inactivează mai rapid în intervalul 60-67,5°C și respectiv 65-72,5°C.



**Figura 4.7.** Inactivarea termică a FA conform modelului Weibull în lapte **degresat** de a) oaie, b) capră și c) vacă la diferite temperaturi

În tabelul 4.5 sunt prezentate comparativ parametrii cinetici aferenți modelului Weibull și cinetic de ordinul I în laptele integral provenit de la diferite specii de animale.

**Tabel 4.5.** Analiza comparativă a parametrilor cinetici de distribuție Weibull și modelului liniar de ordinul I în lapte degresat de a) capră, b) oaie și c) vacă la diferite temperaturi

a)

Temperatura (°C)	Lapte de capră degresat					
	$p^1$	Weibull $\delta^2$ min	$R^2$	$D^3$ min	Liniar $k \times 10^{-2}$ min <sup>-1</sup>	$R^2$
60	1,15±0,24	31,51±2,12	0,986	38,33±3,55	6,00±0,21	0,957
62,5	0,88±0,18	15,71±1,70	0,981	16,68±0,9	13,80±0,76	0,978
65	0,79±0,08	3,01±0,17	0,994	5,19±0,05	44,37±2,14	0,984
67,5	0,73±0,18	2,52±0,09	0,989	2,40±0,2	95,95±7,12	0,981
70	0,75±0,15	0,65±0,06	0,975	0,75±0,02	307,06±10,32	0,956
72,5	1,13±0,16	0,38±0,02	0,989	0,58±0,01	397,06±25,11	0,986
z (°C)		6,66 ± 0,02			6,49 ± 0,10	

b)

Temperatura (°C)	Lapte de oaie degresat					
	$p^1$	Weibull $\delta^2$ min	$R^2$	$D^3$ min	Liniar $k \times 10^{-2}$ min <sup>-1</sup>	$R^2$
60	0,97±0,15	25,15±1,99	0,988	25,58±1,32	9,32±0,7	0,988
62,5	0,67±0,10	13,64±1,02	0,988	15,99±0,98	14,21±1,24	0,966
65	1,23±0,32	3,97±0,65	0,961	3,73±0,42	61,12±3,57	0,957
67,5	0,86±0,32	2,77±0,12	0,944	3,27±0,08	70,48±3,64	0,924
70	0,46±0,08	1,06±0,03	0,978	1,96±0,04	117,93±9,32	0,869
72,5	1,03±0,18	0,21±0,01	0,983	0,29±0,01	794,18±34,2	0,983
z (°C)		6,32 ± 0,17			6,94 ± 0,05	

c)

Temperatura (°C)	Lapte de vacă degresat					
	$p^1$	Weibull $\delta^2$ min	$R^2$	$D^3$ min	Liniar $k^4 \times 10^{-2}$ min <sup>-1</sup>	$R^2$
60	0,61±0,12	44,66±3,61	0,976	38,38±1,85	6,19±0,34	0,897
62,5	0,83±0,20	23,44±2,43	0,980	28,05±1,76	8,98±0,47	0,968
65	0,77±0,04	3,57±0,29	0,998	4,13±0,34	55,85±4,37	0,986
67,5	0,98±0,27	2,69±0,12	0,972	1,81±0,08	127,59±9,45	0,972
70	0,82±0,20	1,61±0,05	0,969	1,42±0,05	162,98±11,24	0,965
72,5	0,71±0,08	0,59±0,05	0,992	0,54±0,01	426,49±20,50	0,968
z (°C)		6,72 ± 0,03			6,80 ± 0,06	

<sup>1</sup>-factor de formă, <sup>2</sup>-factor de scală, <sup>3</sup>-timp de reducere decimală, <sup>4</sup>-constanta vitezei de inactivare

Factorul de formă  $p$  a prezentat valori aproximativ egale în laptele de capră și vacă pentru intervalul de temperatură 62,5-70°C. Pentru laptele de oaie și capră, la temperatura de 70°C, valoarea lui  $p$  a fost de 1,03±0,18 și respectiv 1,13±0,16, sugerând sensibilitatea termică a moleculelor enzimatică rămase.

În literatura de specialitate nu au fost găsite informații detaliate referitoare la cinetica de inactivare termică a FA din laptele de oaie sau capră.



---

Luând în considerare datele prezentate în tabelul 4.4. și tabelul 4.5., inactivarea termică a FA din laptele de capră, oaie și vacă este dependentă de compoziția mediului și de combinațiile de timp și temperatură aplicate.

Energia de activare ( $E_a$ ) a fost calculată din reprezentarea grafică a logaritmului natural al constantei vitezei de inactivare în funcție de inversul temperaturii absolute în Kelvin. Valorile energiei de activare obținute în lapte degresat și integral conform modelului cinetic de ordinul I sunt:  $341,53 \pm 2,41$  kJ/mol și  $373,04 \pm 5,48$  kJ/mol (lapte de capră),  $315,60 \pm 4,48$  kJ/mol și  $378,52 \pm 1,45$  kJ/mol (lapte de oaie) și  $341,14 \pm 3,57$  kJ/mol și  $311,70 \pm 2,49$  kJ/mol (lapte de vacă). Energia de activare din laptele integral este mai mare cu 8,44% (capră), 16,62% (oaie) față de laptele degresat, în timp ce pentru laptele de vacă  $E_a$  este mai mică cu 8,62%. Laptele degresat de capră și vacă prezintă valori comparabile pentru  $E_a$ . [Wilinska și al., \(2007\)](#) au raportat valori mai mari pentru  $E_a$  de 421 kJ/mol în laptele de vacă și 406 kJ/mol în laptele de capră.

Rezultate similare au fost înregistrate și între laptele integral de oaie și capră, precum și între laptele degresat de oaie și laptele integral de vacă. Acest lucru indică faptul că pentru inițierea procesului de inactivare a FA din laptele degresat de capră și vacă este necesară o cantitate mai mare de energie.

#### 4.4 Concluzii

Capitolul intitulat Cercetări privind cinetica de inactivare a fosfatazei alcaline cuprinde studiile efectuate în vederea testării eficienței unui nou substrat cunoscut sub numele de 8-chinolil-fosfat în determinarea activității enzimatică în laptele crud provenit de la diferite specii, acest substrat fiind testat până în prezent doar în domeniul medical. Au fost stabilite condițiile optime de lucru pentru fiecare tip de lapte iar pentru studiul termocinetic au fost testate două modele dintre care, modelul Weibull a fost aplicat pentru prima dată în analiza cinetică a acestei enzime. Concluziile observate în timpul studiului sunt următoarele:

- Metoda fluorimetrică, ce utilizează ca substrat 8-chinolil-fosfatul, este simplă, practică și poate fi utilizată pentru determinarea fosfatazei alcaline atât în laptele bovin cât și nebovin;
- Față de metodele colorimetrice, metoda fluorimetrică analizată prezintă o limită de detecție de 1% din activitatea enzimatică existentă în laptele integral crud. Această limită de detecție este inferioară față de cea obținută prin metode colorimetrice, unde pragul este de 0,1-0,5% din activitatea enzimatică inițială sau cu metoda Fluorophos unde limita de detecție este de 0,006%;
- Activitatea enzimatică cea mai ridicată s-a înregistrat în laptele de oaie, urmată de laptele de vacă și capră, unde aproximativ 40% din activitatea acestora a fost asociată cu membrana globulei de grăsime;
- Inactivarea termică a fosfatazei alcaline din lapte de capră, oaie și vacă a fost analizată comparativ cu ajutorul modelului cinetic de ordinul I și a modelului Weibull;
- Modelul Weibull, alături de modelul cinetic de ordinul I, poate fi utilizat pentru descrierea cu acuratețe a comportamentului termic al enzimei;
- În cinetica de inactivare, creșterea temperaturii a condus la pierderea activității catalitice a enzimei, inactivarea termică fiind dependentă de compoziția mediului și combinațiile de timp și temperatură aplicate;

- 
- La temperatură joasă, în cinetica de inactivare a laptelui integral nu au fost înregistrate diferențe între specii, în timp ce în laptele degresat, valoarea timpului de reducere decimală a prezentat valori similare doar pentru laptele de vacă și capră;
  - La temperatura de 72,5°C, enzima din laptele de oaie atât integral cât și degresat a prezentat cea mai mare sensibilitate termică;
  - Spre deosebire de laptele integral, timpul necesar reducerii cu 90% a activității enzimatice a prezentat valori mai scăzute în laptele degresat;
  - Termostabilitatea diferită a fosfatazei alcaline în laptele provenit de la diferitele specii poate fi explicată și prin conformația specifică moleculei, care poate influența mecanismul de inactivare.

În concluzie, metoda fluorimetrică ce utilizează ca substrat 8-chinolil fosfatul nu poate fi utilizată drept alternativă la metodele standardizate de determinare a activității enzimatice în laptele pasteurizat, limita de detecție fiind de 800mU/L, față de 350mU/L cât prevăd standardele în vigoare (Norma europeană Nr. 1664/2006).

## Capitolul 5

### Cercetări privind cinetica de inactivare a $\gamma$ -glutamil transferazei

#### 5.2 Materiale, metode și echipamente utilizate

##### 5.2.1 Materiale

Probele de lapte utilizate ca soluții enzimatică au fost obținute conform metodologiei descrise în **Capitolul 4, Subcapitolul 4.2.1.2**, cu deosebirea că probele au provenit din loturi de lapte colectate pe o perioadă de trei luni (iulie-septembrie 2011).

##### 5.2.2 Inactivarea termică a enzimei

Tratamentul termic a fost realizat în condiții similare cu cele descrise la **Capitolul 4, Subcapitolul 4.2.2**, utilizându-se combinații de temperatură cuprinse între 60 și 70°C, timp de menținere 0-40 minute.

##### 5.2.3 Determinarea activității enzimatice

Activitatea enzimatică a GT a fost determinată spectrofotometric după o metodă descrisă de [Zehetner și al., \(1995\)](#). După efectuarea tratamentului termic și diluarea corespunzătoare cu apă distilată, un volum de 50  $\mu$ L de soluție enzimatică a fost adăugat peste 2,5 mL de substrat proaspăt preparat. Substratul a fost format din 0,1 M Tris, 89 mM NaCl, 48 mM glicil-glicină și 4,8 mM  $\gamma$ - glutamil-p-nitroanilidă. Atât proba precum și substratul au fost încălzite separat pe baia de apă fixată la 40°C, înainte de măsurarea activității enzimatice. Activitatea enzimatică a fost determinată cu ajutorul spectrofotometrului Cintra GBS UV-VIS (Australia), prin măsurarea creșterii absorbanței la 410 nm, timp de 15 minute. Proba martor a constat din 2,5 mL soluție tampon și 50  $\mu$ L apă distilată. Coeficientul molar de extincție pentru p-nitroanilidă la lungimea de undă de 410 nm a fost de 8,8 L/cm mMol.

---

Activitatea GT a fost exprimată în unități enzimatică. O unitate de activitate enzimatică (U) este echivalentă unui 1 mM de p-nitroanilidă eliberată într-un minut dintr-un mL de lapte.

A fost realizat și un test de reactivare pentru a verifica (i)reversibilitatea reacțiilor. Nu a fost observată o reactivare a enzimei după o perioadă de păstrare de o săptămână la maxim 6°C.

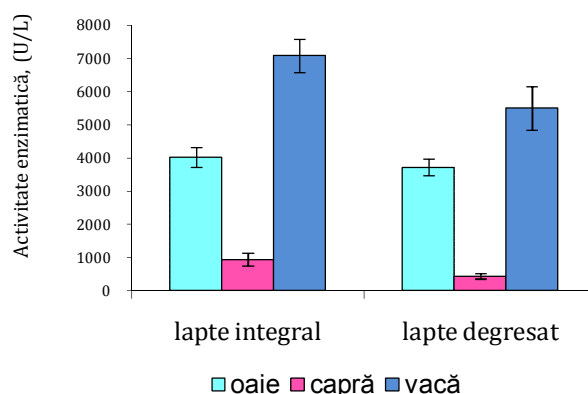
#### 5.2.4 Analiza cinetică a datelor

Cinetica de inactivare a GT a fost descrisă conform metodologiei prezentate în **Capitolul 4 Subcapitolul 4.2.2.4**.

### 5.3 Rezultate și discuții

#### 5.3.1 Distribuția GT în laptele de capră și oaie și vacă

După cum se poate observa din figura 5.1., valorile înregistrate pentru activitatea GT au fost diferite în toate probele de lapte analizate. Similar cu FA, activitatea GT este corelată cu membrana globulei de grăsime. În laptele integral, activitatea enzimatică a GT a fost mai ridicată spre deosebire de laptele degresat.



**Figura 5.1.** Activitatea GT în laptele de oaie, capră și vacă

Valorile enzimatică medii obținute în laptele integral au fost următoarele: 4025±294 U/L (oaie), 951±193 U/L (capră) și respectiv 7081±505 U/L (vacă). Analizând valorile obținute, se poate observa că laptele de oaie prezintă 56,83%±0,14% iar laptele de capră 13,30±2,51% din activitatea enzimatică inițială existentă în laptele de vacă.

În ceea ce privește laptele degresat, activitatea enzimatică măsurată a fost de 3727±255 U/L în laptele de oaie, 437±78 U/L în laptele de capră și 5503±654 U/L în laptele de vacă.

#### 5.3.2 Influența grăsimii asupra distribuției GT în lapte

Grăsimea este prezentă în lapte sub formă de globule sferice de diferite dimensiuni ce influențează compoziția acizilor grași din lapte. Activitățile enzimatică obținute au fost analizate în raport cu conținutul de proteine, lactoză și grăsime (tabel 5.1.). Rezultatele obținute pentru laptele de vacă cu privire la distribuția activității GT sunt similare cu cele specificate în literatură. Astfel, 77,71±2,31% din activitatea GT a fost regăsită în laptele degresat de vacă.

Laptele de oaie, prezintă o compoziție diferită și un conținut mult mai mare de grăsime în

comparație cu laptele de vacă. În laptele degresat de oaie a fost regăsită 75,8% din activitatea GT din laptele integral, în timp ce în laptele de capră 53,8%. Aceste rezultate sunt confirmate și de raportul dintre activitatea enzimatică a GT și lactoză care prezintă cele mai ridicate valori în fracțiunea grasă. În literatura de specialitate nu au fost găsite studii cu privire la influența pe care o are globula de grăsime asupra distribuției GT în laptele de capră și oaie.

**Tabel 5.1.** Distribuția medie a GT în laptele de vacă, oaie și capră

Lapte	Proteine (%)	Lactoză (%)	Grăsime (%)	GT (U/L)	GT (%)	Raport GT/Lactoză
<b>Vacă</b>						
integral	3,43	4,50	3,96	7081	100	1573
smântână	1,80	2,98	45	14845	20,49	4981,54
degresat	3,53	4,61	0,30	5503,44	77,71	1193,80
<b>Oaie</b>						
integral	4,68	6,17	8,39	4917	100	796,92
smântână	2,20	3,1	50	11712	23,9	3778
degresat	6,40	8,36	0,34	3727	75,79	445,81
<b>Capră</b>						
integral	3,45	4,52	4,50	951	100	210,39
smântână	1,7	2,67	47	5432	51,12	2034,45
degresat	3,56	4,6	0,2	437	45,95	95

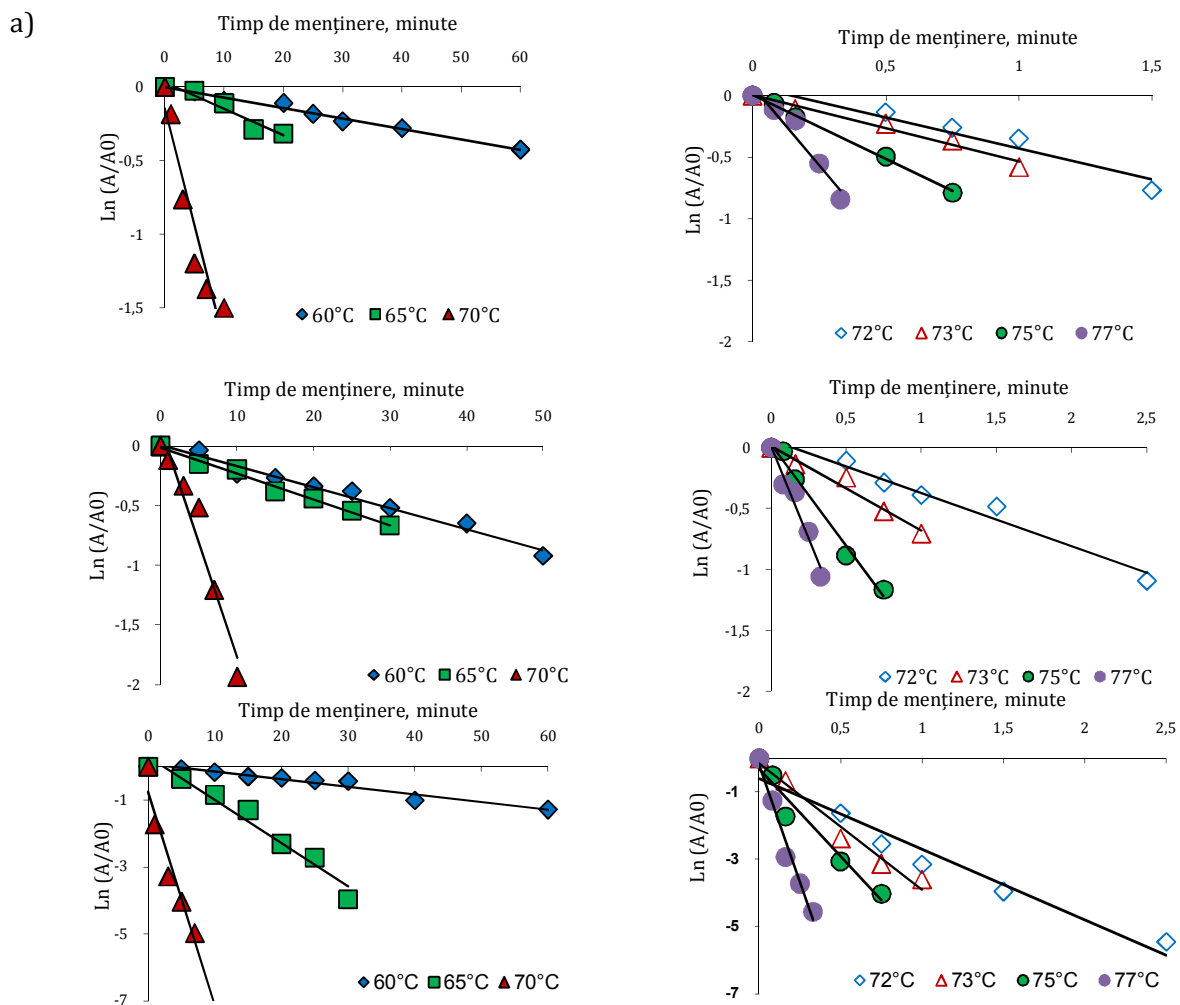
Laptele de oaie prezintă o compoziție diferită și un conținut mult mai mare de grăsime în comparație cu laptele de vacă. În laptele degresat de oaie a fost regăsită 75,8% din activitatea GT din laptele integral, în timp ce în laptele de capră 53,8%. Aceste rezultate sunt confirmate și de raportul dintre activitatea enzimatică a GT și lactoză care prezintă cele mai ridicate valori în fracțiunea grasă. În literatura de specialitate nu au fost găsite studii cu privire la influența pe care o are globula de grăsime asupra distribuției GT în laptele de capră și oaie.

### 5.3.3 Inactivarea termică

Stabilitatea termică a GT a fost examinată în domeniul de temperatură 60-77°C în laptele de capră și oaie în comparație cu laptele de origine bovină, cu scopul de a verifica capacitatea acestei enzime de a fi utilizată în calitate de indicator al eficienței tratamentului termic în laptele de origine nebovină.

Efectul tratamentului termic asupra comportamentului de inactivare a GT în diferite tipuri de lapte și exprimată ca valoare reziduală în funcție de activitatea enzimatică inițială este reprezentată grafic (prin intermediul modelului cinetic de ordinul I) în funcție de timpul de menținere în figura 5.4. și figura 5.5. Ținând cont de scala diferită referitoare la abscisă, s-a decis reprezentarea în două grafice pentru a facilita percepția rezultatelor. Variația de temperatură-timp și conținut de grăsime a condus la diferențe semnificative între probele de lapte analizate. Gradul de inactivare a GT a crescut odată cu creșterea temperaturii și a timpului de menținere.

Laptele de oaie încălzit la 60°C, timp de 40 minute a prezentat o activitate reziduală relativă pentru GT de 80,22±1,23% în laptele degresat și de 75,69±2,1 % în laptele integral. În schimb, la 65°C, GT s-a inactivat mai rapid în laptele degresat spre deosebire de laptele integral. În intervalul de temperatură 65-70°C, panta dreptelor crește semnificativ, iar la temperatura de 77° C dreptele de regresie devin din ce în ce mai apropiate.

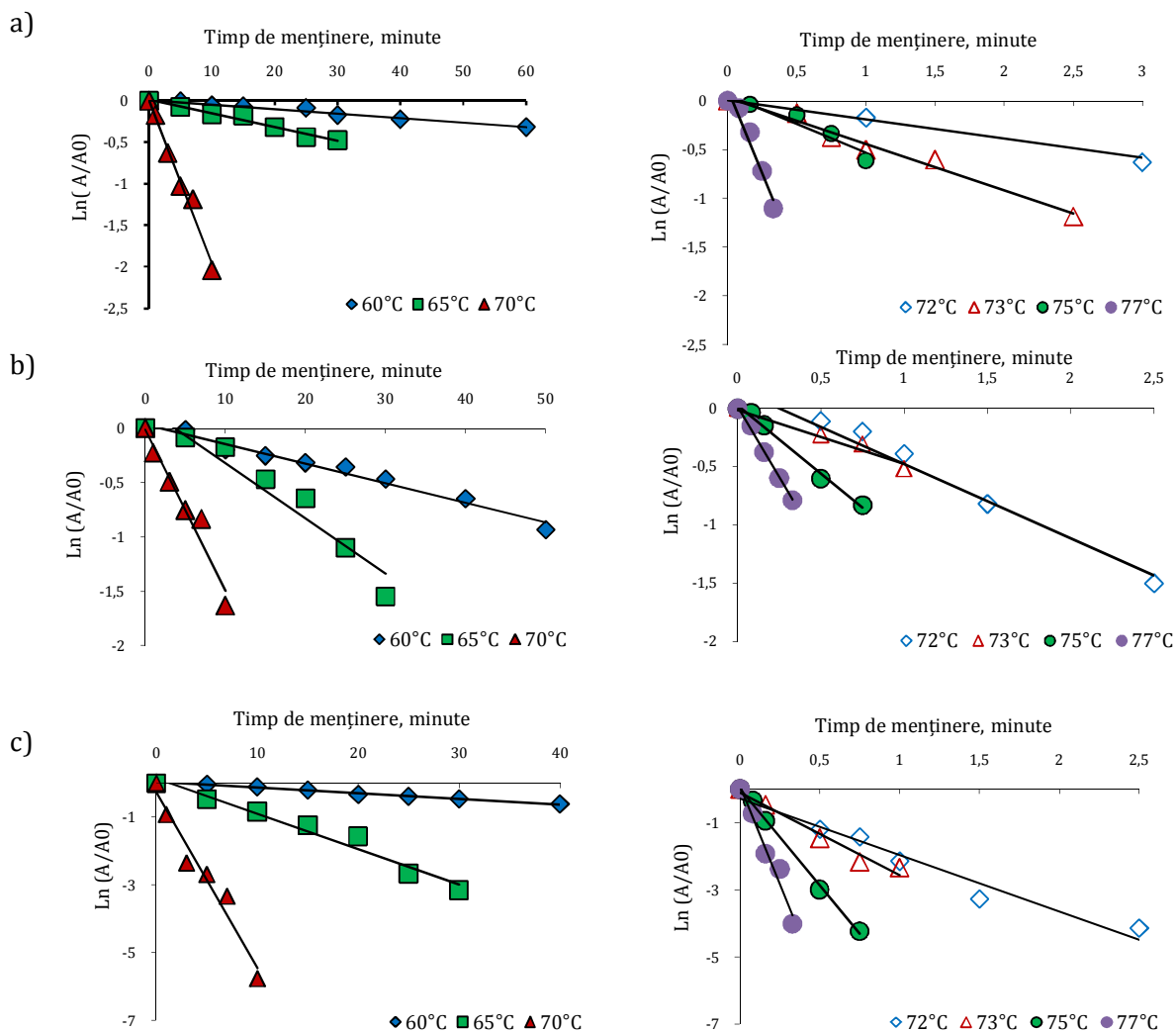


**Figura 5.4** Inactivarea termică de ordinul I a GT la diferite temperaturi în lapte **integral** de a) oaie b) capră, c) vacă  
(A reprezintă activitatea enzimatică la timpul  $t$ ,  $A_0$  activitatea enzimatică inițială)

Laptele de oaie încălzit la 60°C, timp de 40 minute a prezentat o activitate reziduală relativă pentru GT de  $80,22 \pm 1,23\%$  în laptele degresat și de  $75,69 \pm 2,1\%$  în laptele integral. În schimb, la 65°C, GT s-a inactivat mai rapid în laptele degresat spre deosebire de laptele integral. În intervalul de temperatură 65-70°C, panta dreptelor crește semnificativ, iar la temperatura de 77°C dreptele de regresie devin din ce în ce mai apropiate.

Spre deosebire de laptele integral de vacă, la laptele de capră și de oaie se observă că, în intervalul de temperatură 60-65°C, procesul de inactivare decurge lent. Creșterea cu 5°C, peste temperatura de 65°C a condus la mărirea semnificativă a pantei dreptelor.

În laptele integral de capră spre deosebire de cel degresat, GT este mult mai termostabilă după un tratament termic efectuat timp de 40 de minute la 60°C. În intervalul 60-65°C, enzima se inactivează mult mai rapid în laptele degresat, fapt ce se observă ușor și din panta dreptelor. Enzima se inactivează rapid odată cu creșterea temperaturii de la 70°C la 77°C, dreptele de regresie devenind foarte apropiate.



**Figura 5.5.** Inactivarea termică de ordinul I a GT la diferite temperaturi în lapte **degresat** de a) oaie, b) capră, c) vacă  
(A reprezintă activitatea enzimatică la timpul  $t$ ,  $A_0$  activitatea enzimatică inițială)

Pentru laptele degresat, în intervalul de temperatură 60-65°C inactivarea GT este mult mai rapidă în laptele capră spre deosebire de laptele de oaie. În laptele de vacă, GT este aproape inactivată la aplicarea unui tratament termic de 77°C timp de 20 de secunde; valoarea reziduală enzimatică fiind de  $1,8 \pm 0,02\%$  în laptele integral și  $1,03 \pm 0,01\%$  în laptele degresat. Aceleași condiții de tratament termic au avut o influență mai mică asupra GT din laptele de oaie, activitățile enzimatiche reziduale înregistrate au fost de  $32,1 \pm 0,2\%$  (lapte integral) și  $33,2 \pm 0,4\%$  (lapte degresat). O activitate enzimatică similară a fost observată în laptele integral de capră ( $34,7 \pm 0,5\%$ ), în timp ce valoarea enzimatică reziduală cea mai ridicată înregistrată pentru GT a fost în laptele degresat de capră cu o valoare de  $45,5 \pm 0,3\%$ .

### 5.3.4 Parametrii cinetici și termodinamici

În termeni cinetici, GT în toate tipurile de lapte analizate a fost modelată prin intermediul modelului de inactivare de ordinul I și Weibull. Valorile aferente lui  $D$  și  $R^2$  pentru inactivarea GT în

probele de lapte analizate prin intermediul modelului cinetic de ordinul I sunt prezentate în tabelul 5.5 și 5.6. Cum era de așteptat, valorile lui  $D$  au scăzut odată cu creșterea temperaturii de la 60 la 70°C, indicând o inactivare rapidă a GT la temperaturi ridicate.

**Tabelul 5.5** Valorile pentru timpul de reducere decimală ( $D$ ) și creșterea de temperatura necesară reducerii de 10 ori a valorii  $D$  ( $z$ ) pentru GT în laptele de capră, oaie și vacă, a) lapte integral, b) lapte degresat aferente modelului cinetic de ordinul I (Dumitrașcu și al., 2012)

a) lapte integral

Temperatura, °C	Lapte de capră		Lapte de oaie		Lapte de vacă	
	$D$ (min)	$R^2$	$D$ (min)	$R^2$	$D$ (min)	$R^2$
60	59,52±5,2	0,87	163,93±22,98	0,92	68,75±5,99	0,94
65	43,70±1,88	0,97	78,74±9,94	0,95	7,18±1,44	0,95
70	7,09±1,08	0,95	6,60±0,09	0,9	1,53±0,04	0,97
72	2,27±0,86	0,97	4,33±0,58	0,97	0,42±0,07	0,94
73	1,44±0,006	0,9	1,84±0,18	0,98	0,26±0,001	0,97
75	0,73±0,18	0,98	0,59±0,25	0,95	0,18±0,002	0,97
77	0,33±0,009	0,97	0,28±0,07	0,97	0,07±0,003	0,98
$z$ (°C)	7,09 ± 0,09		5,88 ± 0,027		5,80 ± 0,05	

b) lapte degresat

Temperatura, °C	Lapte de capră		Lapte de oaie		Lapte de vacă	
	$D$ (min)	$R^2$	$D$ (min)	$R^2$	$D$ (min)	$R^2$
60	69,52±8,81	0,94	200±9,02	0,95	59,35±0,74	0,92
65	24,30±7,84	0,97	60,6±18,59	0,98	10,11±3,74	0,95
70	8,40±0,09	0,96	5,08±0,55	0,94	2,03±0,20	0,96
72	2,35±0,74	0,94	2,10±0,10	0,99	0,50±0,06	0,94
73	1,87±0,43	0,97	1,69±0,07	0,97	0,34±0,08	0,98
75	0,82±0,04	0,98	1,03±0,04	0,97	0,18±0,02	0,98
77	0,52±0,03	0,97	0,31±0,03	0,96	0,07±0,01	0,97
$z$ (°C)	8,02 ± 0,23		5,97 ± 0,08		5,83 ± 0,01	

Comparând probele în funcție de conținutul de grăsime, se poate observa că la temperatură scăzută (60°C), GT se inactivează mai rapid în laptele integral de oaie și capră. Pentru laptele de vacă, valoarea aferentă lui  $D$  a fost mai ridicată în laptele integral față de laptele degresat. Caracteristicile specifice globulei de grăsime în laptele de vacă față de cel de origine nebovină justifică probabil diferențele apărute.

La temperatură scăzută, GT este mult mai stabilă în laptele degresat de oaie, urmat de cel de capră și vacă, în timp ce la temperatură ridicată (77°C), GT este mult mai stabilă în laptele de capră spre deosebire de celelalte probe de lapte analizate.

Valorile energiei de activare obținute pentru inactivarea GT în laptele degresat și integral sunt: 277,59±2,32 kJ/mol și 313,7±3,98 kJ/mol (lapte de capră), 373,16±2,58 kJ/mol și 377,62±1,39 kJ/mol (lapte de oaie) și 384,24±1,45 kJ/mol și 381,44±2,19 kJ/mol (lapte de vacă). În laptele degresat de capră, energia de activare este cu aproximativ 11,5% mai mică în comparație cu laptele integral, în timp ce valorile aferente energiei de activare în laptele de oaie și vacă analizate sunt similare, indiferent de conținutul de grăsime prezent în probe.

Valorile mici obținute pentru energia de activare în laptele degresat de capră sugerează că pentru inițierea procesului de denaturare, respectiv modificarea conformației inițiale active și trecerea în forma inactivă, este nevoie de o cantitate mică de energie.

---

## 5.4 Concluzii

Cercetările prezentate în capitolul intitulat Cinetica de inactivare a  $\gamma$ -glutamil transferazei și-au propus să testeze eficiența  $\gamma$ -glutamil transferazei din laptele de origine bovină și nebovină ca indicator al tratamentului termic cuprins între 70 și 80°C. În prezent, nu există studii de analiză cinetică realizate pe laptele de origine nebovină.

Au fost stabilite condițiile optime de lucru pentru fiecare tip de lapte iar pentru analiza cinetică a datelor au fost testate două modele, din care modelul Weibull a fost aplicat pentru prima dată în analiza cinetică a acestei enzime. Concluziile observate în timpul studiului sunt următoarele:

- Laptele de vacă a prezentat cea mai mare activitate enzimatică pentru  $\gamma$ -glutamil transferază, urmat de laptele de oaie și de capră;
- Activitatea  $\gamma$ -glutamil transferazei este asociată cu membrana globulei de grăsime, activitatea enzimatică cea mai ridicată a fost observată pentru laptele integral;
- Spre deosebire de laptele de vacă și oaie unde aproximativ 25% din activitatea enzimatică este asociată cu fracțiunea grasă, în laptele de capră asocierea enzimei cu globula de grăsime este de 50%;
- La temperatură scăzută,  $\gamma$ -glutamil transferaza este mai stabilă în laptele de oaie, în timp ce la temperatură ridicată (77°C), stabilitatea cea mai mare a  $\gamma$ -glutamil transferazei a fost înregistrată în laptele de capră;
- Analiza Anova a arătat ca nu există diferențe semnificative pentru un nivel de semnificație  $\alpha=0,05$ , între valorile parametrului  $D$  și  $\delta$  aferente celor două modele utilizate;
- Pentru intervalul de temperatură studiat,  $\gamma$ -glutamil transferaza din laptele capră a prezentat cea mai mare termostabilitate față de laptele de vacă și oaie, valorile lui  $z$  aferente modelului cinetic de ordinul I fiind de 7,07°C (lapte integral) și 8,02°C (lapte degresat);
- Analiza Anova bifactorială a arătat că, în cazul ambelor modele utilizate, valorile aferente parametrului  $z$  nu sunt influențate de tipul de lapte sau de conținutul de grăsime din lapte;
- Modelul Weibull alături de modelul cinetic de ordinul I a descris cu acuratețe inactivarea termică a  $\gamma$ -glutamil transferazei;

În concluzie, activitatea  $\gamma$ -glutamil transferazei diferă în funcție de specia de la care provine laptele, diferențe semnificative fiind înregistrate în ceea ce privește activitatea enzimatică existentă în laptele crud. În ceea ce privește cinetica de inactivare, se poate afirma cu o probabilitate de 95% că aceasta nu este semnificativ influențată de specia de la care provine laptele sau de conținutul de grăsime.



---

## Capitolul 6

### Cercetări privind cinetica de inactivare a lactoperoxidazei

#### 6.2 Materiale, metode și echipamente utilizate

##### 6.2.1. Materiale

Probele de lapte au fost obținute conform metodologiei descrise în **Capitolul 3, Subcapitolul 3.2.1.**, cu deosebirea că laptele a fost achiziționat în perioada martie-mai 2011.

##### 6.2.2 Inactivarea termică a enzimei

Pentru reproductibilitate și evaluare comparativă, tratamentul termic a fost realizat în condițiile menționate în **Capitolul 4, Subcapitolul 4.2.2.1.** Au fost testate mai multe combinații de temperatură (70-80°C) și timpi de menținere (0-40 minute). Imediat după finalizarea tratamentului termic, capilarele au fost răcite pe baie de gheață. Fiecare set de experimente a fost repetat de 3 ori. A fost realizat și un test de reactivare pentru a verifica (i)reversibilitatea reacțiilor. Nu a fost observată nici o reactivare a enzimei după o perioadă de păstrare de o săptămână la maxim 6°C.

##### 6.2.3 Determinarea activității enzimaticice

Determinarea activității LP s-a efectuat spectrofotometric la lungimea de undă de 412 nm, cu ajutorul unui spectrofotometru GBC Cintra UV-VIS după o metodă descrisă de [Kumar și Bhatia \(1999\)](#). 0,1 mL de enzimă au fost introduse peste o soluție de substrat proaspăt preparată formată din 1 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolină-6-acid sulfonic) și 0,1 mM tampon fosfat, pH 6. Pentru inițierea reacției a fost adăugată o soluție proaspătă de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0,1 mL) de concentrație 3,2 mM. Măsurarea absorbanței a fost realizată timp de 5 minute. Proba martor utilizată în măsurătorile experimentale a fost formată din substrat și 0,1mL lapte tratat termic la 95°C, timp de 1 minut, pentru care s-a apreciat o activitate enzimatică negativă.

O unitate de activitate (U) a fost definită ca fiind cantitatea de enzimă ce catalizează oxidarea unui μmol de ABTS la 20°C.

##### 6.2.4 Analiza cinetică

Analiza cinetică a datelor a fost realizată conform principiului de calcul descris la **Capitolul 4, Subcapitolul 4.2.2.4.**

Parametrii cinetici au fost estimați prin regresie liniară a valorilor relative reziduale de răspuns într-un model global (metoda într-un singur pas).

##### 6.2.5 Prelucrarea statistică a datelor

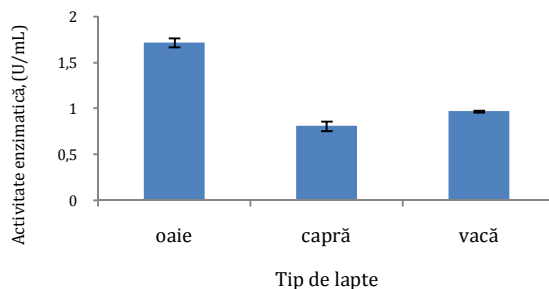
Valorile experimentale și parametrii cinetici au fost estimați cu ajutorul programului SAS, versiunea 9.2 ([SAS Institute, Cary, USA](#)) și cu ajutorul programului GlnaFit descris în **Capitolul 4 Subcapitolul 4.2.3.1.**

#### 6.3 Rezultate și discuții

##### 6.3.1 Activitatea enzimatică a LP

Compoziția fizico-chimică medie a laptelui de capră, oaie și vacă utilizate în acest studiu sunt prezentate în tabelul 3.1.

Activitatea enzimatică calculată în fiecare tip de lapte și exprimată ca U/mL este prezentată în figura 6.1.



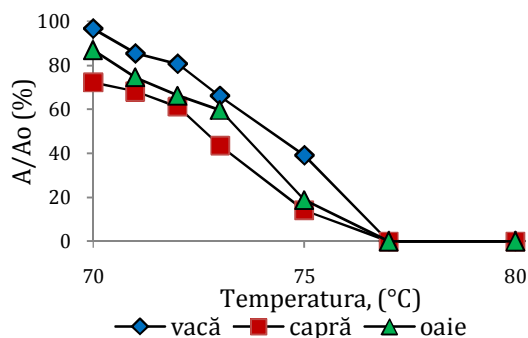
**Figura 6.1.** Activitatea enzimatică a LP în lapte de capră, oaie și vacă

După cum se poate observa, activitatea enzimatică a LP a fost diferită în toate cele trei tipuri de lapte analizate. În acest studiu activitatea LP a fost de  $1,72\pm 0,05$  U/mL în laptele de oaie,  $0,81\pm 0,05$  U/mL în laptele de capră și  $0,97\pm 0,012$  U/mL în laptele de vacă. Laptele de capră și vacă prezintă  $47,09\pm 1,2\%$  și respectiv  $56,39\pm 2,34\%$  din activitatea enzimatică prezentă în laptele de oaie.

### 6.3.2. Inactivare termică

Stabilitatea termică a LP din laptele de capră, oaie și vacă a fost examinată în intervalul de temperatură cuprins între 70-80°C, cu scopul de a verifica eficacitatea acestei enzime de a fi utilizată drept indicator de evaluare și control al eficienței tratamentului termic.

În figura 6.2. sunt prezentate activitățile reziduale relative ale LP în diferite tipuri de lapte la timp constant (5 minute) și temperaturi de inactivare diferite. La temperatura de 70°C, activitatea enzimatică a fost  $87,2\pm 3,7\%$ ,  $70,05\pm 2,9\%$  și  $96,5\pm 2,9\%$  în lapte de capră, oaie și respectiv lapte de vacă. În schimb, activitatea enzimatică reziduală la 75°C după 5 minute de tratament termic a fost  $10,8\pm 3,0\%$  (lapte de capră),  $8,9\pm 4,3\%$  (lapte de oaie) și  $39,8\pm 13,8\%$  (lapte de vacă).

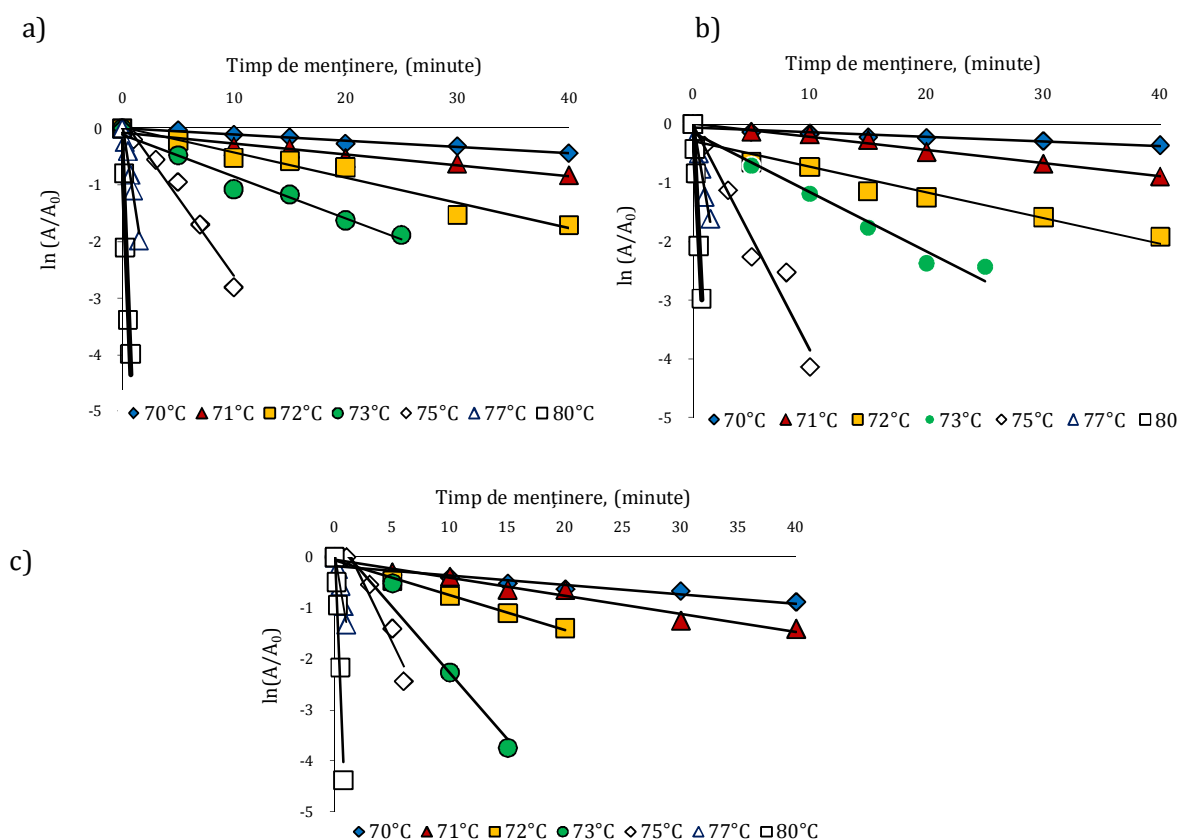


**Figura 6.2.** Stabilitatea termică după 5 minute de tratament termic la temperaturi diferite a LP în lapte de vacă, capră și oaie. Valorile reprezintă media a trei experimente

### 6.3.3 Parametrii cinetici și termodinamici

Cinetica de inactivare termică a LP a fost studiată în cele trei tipuri de lapte, rezultatele obținute prin determinarea activității LP după tratamentul termic la diferite temperaturi sunt specifice unei inactivări termice ce urmează un model cinetic de ordinul I (figura 6.5., a, b, c ).

Se observă că inactivarea decurge lent în intervalul de temperatură 70-72°C, după care panta dreptelor crește din ce în ce mai mult, iar dreptele de regresie devin la rândul lor din ce în ce mai apropiate.



**Figura 6.5.** Inactivarea termică de ordinul I a LP în lapte de a) vacă, b) capră, c) oaie ( $A$  reprezintă activitatea enzimatică la timpul  $t$ ,  $A_0$  activitatea enzimatică inițială).  
(Dumitrașcu și al., 2012)

Relația dintre sensibilitatea termică a unui microorganism țintă și un indicator termic intrinsec a fost exprimată prin determinarea valorilor lui  $D$  și  $z$ . Valorile lui  $D$  și ale factorului  $z$  corespunzătoare LP în probele de lapte analizate sunt prezentate în tabelul 6.1.

**Tabel 6.1.** Valorile pentru timpul de reducere decimală ( $D$ ), creșterea de temperatură necesară reducerii de 10 ori a valorii  $D$  ( $z$ ) și coeficienții de corelație ( $R^2$ ) la inactivarea LP în laptele de capră, oaie și vacă

Temperatura, °C	Lapte de capră		Lapte de oaie		Lapte de vacă	
	$D$ (min)	$R^2$	$D$ (min)	$R^2$	$D$ (min)	$R^2$
70	107,97±9,85	0,87	38,44±7,38	0,92	89,52±10,69	0,94
71	43,85±8,98	0,97	21,41±2,86	0,95	42,88±3,38	0,95
72	24,55±8,78	0,95	8,67±1,18	0,9	22,97±0,70	0,97
73	8,90±1,63	0,97	5,25±0,97	0,97	13,59±1,02	0,94
75	2,97±0,18	0,9	1,86±0,45	0,98	3,68±0,14	0,97
77	0,88±0,11	0,98	0,68±0,04	0,95	0,77±0,14	0,97
80	0,25±0,09	0,97	0,20±0,01	0,97	0,21±0,04	0,98
$z$ (°C)	3,78 ± 0,014		4,44 ± 0,29		3,49 ± 0,007	

Valorile lui  $D$  au scăzut odată cu creșterea temperaturii de la 70 la 80°C, indicând o inactivare mai rapidă a LP la temperaturi ridicate.

Cele mai mici valori obținute pentru timpul de reducere cu 90% a activității enzimatică au fost obținute la temperatura de 80°C și au fost similare în toate tipurile de lapte analizat.

Valorile constantelor de inactivare termică obținute prin analiza cinetică de ordinul I sunt prezentate în tabelul 6.4.

**Tabel 6.4** Constantele de viteză de inactivare și valorile energiei de activare ale LP în laptele de capră, oaie și vacă

Temperatura, °C	$k \times 10^{-2}$ (min <sup>-1</sup> )		
	Lapte de capră	Lapte de oaie	Lapte de vacă
70	2,14±0,1	5,2±0,11	2,59±0,03
71	5,26±1,2	10,75±0,2	5,68±0,3
72	10,01±3,5	29,36±0,4	10,02±0,3
73	26,30±4,8	96,0±0,6	16,98±1,2
75	77,53±3,5	123,55±2,2	64,19±1,4
77	262,17±33,6	335,78±21,2	302,36±5,7
80	991,30±64,6	1101,43±61,1	1106,92±24,6
$E_a$ (kJ/mol)	612,62±32,42	521,50±33,58	662,61±18,18

Valorile lui  $k$  cresc în intervalul 70-80°C, demonstrând o creștere a vitezei de inactivare.

Energia de activare pentru inactivarea LP în laptele de oaie este cu 25% și respectiv 15% mai mică în comparație cu energia de activare obținută în laptele de capră și vacă. Acest lucru indică faptul că pentru inițierea procesului de denaturare a LP în laptele de oaie este necesară o cantitate mare de energie.

#### 6.4 Concluzii

Studiile prezentate în capitolul intitulat Cercetări privind cinetica de inactivare a lactoperoxidazei au avut ca obiectiv principal studierea rolului potențial pe care îl prezintă LP din laptele de oaie și capră în comparație cu cea din laptele de vacă în monitorizarea eficienței tratamentului termic. Tratamentul termic a vizat atât intervalul specific de pasteurizare, cât mai ales tratamentele termice severe, pornind de la ipoteza că parametrii de procesare termică a laptelui de origine nebovină pot fi diferiți de cei utilizați în cazul laptelui de origine bovină. Au fost stabilite condițiile optime de lucru pentru fiecare tip de lapte, concluziile observate în timpul studiului fiind următoarele:

- A fost determinată simultan pentru prima dată activitatea enzimatică a lactoperoxidazei în laptele de capră, oaie și vacă;
- Inactivarea termică a lactoperoxidazei din laptele de capră, oaie și vacă a fost analizată comparativ cu ajutorul modelului cinetic de ordinul I și a modelului Weibull;

- După aplicarea unui tratament termic la 70°C timp de 5 minute, termostabilitatea cea mai ridicată a prezentat-o lactoperoxidaza din laptele de vacă, urmată de laptele de oaie și capră;
- La temperatura de 80°C nu au fost identificate diferențe în cinetica de inactivare a enzimei în cele trei tipuri de lapte analizate prin intermediul celor două modele utilizate;
- Analiza Anova bifactorială a demonstrat că valorile aferente parametrului  $z$  nu sunt semnificativ influențate de modelul utilizat sau de tipul de lapte analizat;
- Analiza Anova bifactorială a arătat că valorile aferente constantelor de inactivare termică sunt influențate semnificativ de tipul de lapte și de temperatura aplicată;
- Valoarea cea mai mare pentru energia de activare a fost obținută pentru lactoperoxidaza din laptele de oaie, ceea ce sugerează o termostabilitate mai mare a LP odată cu creșterea temperaturii;
- Au fost puși pentru prima dată în evidență parametrii cinetici aferenți lactoperoxidazei din laptele de oaie;
- Modelul Weibull, alături de modelul cinetic de ordinul I, poate fi utilizat pentru descrierea cu acuratețe a comportamentului de inactivare termică a lactoperoxidazei;

Pe baza rezultatelor obținute, se poate afirma că LP poate fi utilizată ca indicator de diferențiere a tratamentelor termice aflate la limita inferioară a pasteurizării înalte.

## Capitolul 7

### Analiza comparativă a cineticii de denaturare/inactivare termică

#### 7.1 Analiza comparativă a activității FA, GT și LP din diferite tipuri de lapte

Analiza comparativă a urmărit formarea unei imagini de ansamblu cu privire la activitatea enzimatică pe care o prezintă FA, GT și LP în diferite tipuri de lapte, rezultatele obținute fiind centralizate în tabelul 7.1.

**Tabel 7.1** Activitatea FA, GT și LP în diferite tipuri de lapte

Enzima	Lapte de oaie		Lapte de capră		Lapte de vacă	
	integral	degresat	integral	degresat	integral	degresat
FA, U/L	3458,4±145,9	2191±123,5	86,74±2,9	52,4±2,1	376,01±61,5	222,7±49,8
GT, U/L	4025±294	3727±255	951±193	437±78	7081±505	5503±654
LP, U/L	1720±5,12	-	810±5,65	-	970±12,4	-

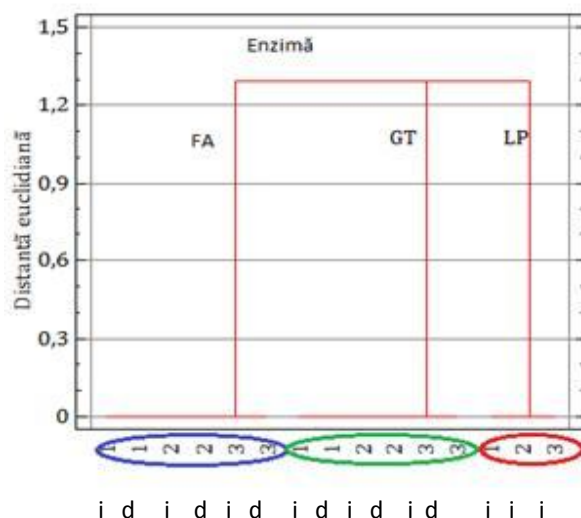
În laptele de oaie, ordinea activității pe care au prezentat-o enzimele studiate a fost următoarea: GT>FA>LP. În laptele de capră și vacă, GT a fost înregistrată cu activitatea cea mai ridicată, urmată apoi de LP și FA.

Se poate observa că pentru GT au fost obținute cele mai ridicate valori ale activității enzimatice, urmată de FA și LP cu diferențe semnificative între speciile de la care provine laptele.

FA se regăsește în proporție de aproximativ 40% în fracțiunea grasă, distribuție ce nu depinde de specia de la care provine laptele. În ceea ce privește GT, aproximativ 25% din activitatea enzimei din laptele de oaie și vacă se regăsește în globula de grăsime, în timp ce pentru laptele de capră mai mult de 50% din activitatea GT este prezentă în fracțiunea grasă.

GT prezintă cea mai mare activitate enzimatică în laptele de vacă, urmat de laptele de oaie și capră. Pentru FA și LP, laptele de oaie prezintă cele mai ridicate valori ale activității enzimaticice urmat de laptele de vacă și capră.

Din dendograma reprezentată în figura 7.1 se poate observa cu ușurință gruparea probelor de lapte utilizate în funcție de tipul de enzimă. În cazul FA și GT, tipurile de lapte apar în duplicat deoarece determinările au fost efectuate atât pe lapte degresat cât și integral.



**Figura 7.1** Dendograma pentru gruparea tipului de enzimă în funcție de tipul de lapte

(1- lapte de oaie , 2- lapte de capră, 3- lapte de vacă, i-integral, d-degresat)

În figura 7.1 se observă clasificarea probelor de lapte analizate în funcție de valoarea activității enzimaticice înregistrate. S-au obținut trei clase principale, în care clusterul împarte în prima clasă FA, în a doua clasă GT, iar în a treia clasă LP.

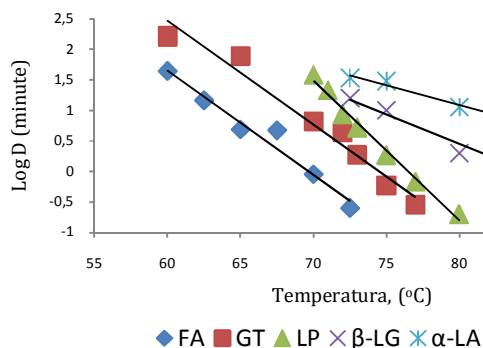
În funcție de această clasificare ce are la bază algoritmi matematici ai metodei celui mai apropiat vecin, se poate estima enzima de la care provine laptele în funcție de activitatea enzimatică.

## 7.2 Analiza comparativă a cineticii de inactivare și denaturare termică în laptele integral

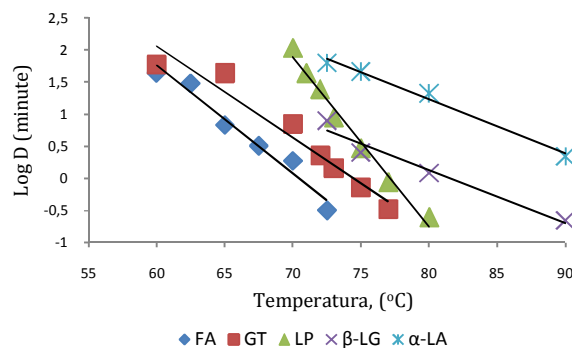
Modelul cinetic de ordinul I și-a dovedit aplicabilitatea pentru toate enzimele și proteinele studiate. Studiul comparativ al cineticii de inactivare și denaturare termică poate oferi informații utile cu privire la modificările structurale specifice fiecărei enzime sau proteine din lapte care apar în timpul tratamentelor termice

Graficele obținute din reprezentarea grafică a  $\log(D)$  versus Temperatură ( $^{\circ}\text{C}$ ) sunt prezentate în figura 7.3, 7.4 și 7.5. În laptele de oaie integral, sensibilitatea termică cea mai ridicată o prezintă LP, în

timp ce GT și FA prezintă valori similare pentru parametrul z. Valorile calculate pentru  $\beta$ -LG și  $\alpha$ -LA sunt mai mari de 2,35 ori și respectiv 3,47 ori față de LP.

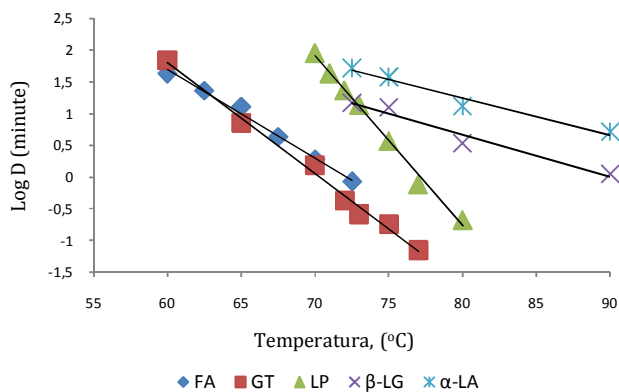


**Figura 7.3** Sensibilitatea termică a FA, GT, LP,  $\beta$ -LG și  $\alpha$ -LA în laptele integral de oaie



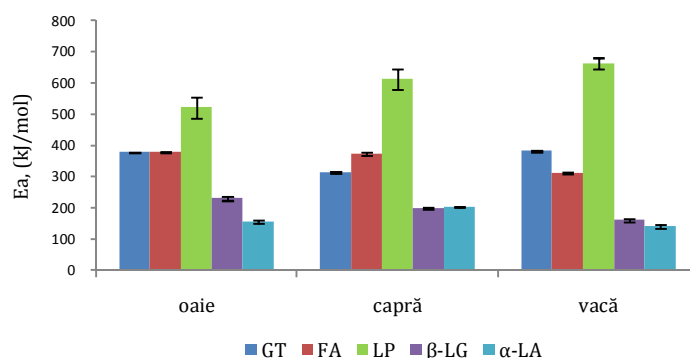
**Figura 7.4** Sensibilitatea termică a FA, GT, LP,  $\beta$ -LG și  $\alpha$ -LA în laptele integral de capră

În laptele de capră integral (figura 7.4), FA prezintă o sensibilitate termică mai mare în comparație cu GT, în timp ce în laptele de vacă integral (figura 7.5) FA este mai puțin sensibilă la acțiunea tratamentului termic față de GT. În laptele de capră și vacă, LP a prezentat cea mai mare sensibilitate față de celelalte componente analizate, în timp ce termostabilitatea cea mai ridicată a fost înregistrată pentru  $\alpha$ -LA.



**Figura 7.5** Sensibilitatea termică a FA, GT, LP,  $\beta$ -LG și  $\alpha$ -LA în laptele integral de vacă

Energia de activare pentru cele trei enzime și două proteine studiate în laptele integral este reprezentată în figura 7.6. Se poate observa că, în cadrul aceluiași tip de lapte, valorile obținute pentru energia de activare diferă semnificativ între componentele analizate.



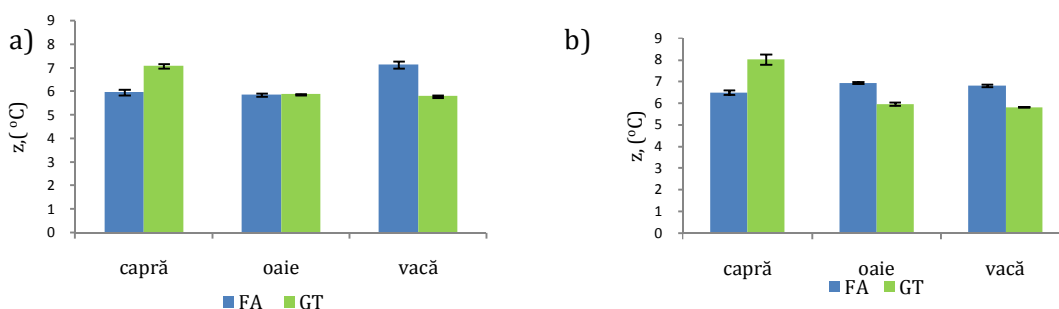
**Figura 7.6** Energia de activare aferentă FA, GT, LP,  $\beta$ -LG și  $\alpha$ -LA în laptele integral de oaie, vacă și capră

În capitolele anterioare s-a demonstrat că cinetica de inactivare a FA, GT și de denaturare a  $\beta$ -LG și  $\alpha$ -LA nu este influențată de specia de la care provine laptele, în timp ce pentru LP, valorile energiei de activare diferă semnificativ între tipurile de lapte studiate.

Pentru a determina dacă în ansamblu, energiile de activare pentru cele cinci componente analizate diferă semnificativ în cadrul aceluiași tip de lapte sau dacă diferențele apar doar în funcție de tipul de lapte s-a aplicat metoda Anova bifactorială. Se poate afirma cu o probabilitate de 95%, că energia de activare nu este semnificativ influențată de specia de la care provine laptele, dar semnificativ influențată de componenta analizată în cadrul aceluiași tip de lapte.

### 7.3 Analiza comparativă a cineticii de inactivare termică enzimatică a GT și FA în laptele degresat

Ca urmare a asocierii FA și GT cu globula de grăsime, analiza comparativă a fost realizată atât în laptele integral cât și degresat. În figura 7.10 (a) sunt redate valorile calculate pentru coeficientul  $z$  în laptele integral, iar în figura 7.10 (b) valorile coeficientului  $z$  pentru laptele degresat.



**Figura 7.10** Valorile coeficientului  $z$  aferente inactivării FA și GT în lapte integral(a) și lapte degresat (b)

Pentru a verifica dacă există diferențe semnificative între valorile aferente parametrului  $z$  corespunzătoare FA și GT s-a utilizat metoda Anova bifactorială.

Din analiza comparativă a rezultatelor corespunzătoare valorilor  $z$  obținute pentru inactivarea FA și GT în laptele integral (tabelul 7.3 a) și degresat (tabelul 7.3 b) se poate afirma cu o probabilitate de 95%



---

că valorile parametrului  $z$  nu sunt influențate semnificativ de tipul enzimă sau de specia de la care provine laptele.

### 7.5 Concluzii

Capitolul 7 intitulat Analiza comparativă parametrilor cinetici de denaturare/inactivare termică, și-a propus să creeze o imagine de ansamblu cu privire la activitatea pe care o prezintă enzimele și proteinele considerate indicatori de diferențiere ai tratamentelor termice, în funcție de specia de la care provine laptele, conținutul de grăsime și tratamentul termic aplicat. Concluziile desprinse sunt următoarele:

- Dintre cele trei enzime studiate,  $\gamma$ -glutamil transferaza prezintă cea mai mare activitate în toate tipurile de lapte analizate;
- Enzimele corelate cu membrana globulei de grăsime nu prezintă același procent de distribuție în fracțiunea grasă. Pentru fosfataza alcalină aproximativ 40% din activitate este prezentă în smântână, în timp ce pentru  $\gamma$ -glutamil transferază procentul este de aproximativ 25% cu o diferență mult mai mare în laptele de capră;
- Dendograma rezultată în urma analizei de clusterizare a clasificat probele de lapte în funcție de tipul de enzimă;
- Analiza comparativă a energiilor de activare pe componente, demonstrează că acestea diferă semnificativ în cadrul aceluiași tip de lapte;
- Analiza Anova a arătat că valorile energiei de activare calculate pentru fiecare componentă analizată nu sunt influențate de specia de la care provine laptele;
- Analiza comparativă a valorilor  $z$  obținute pentru fosfataza alcalină și  $\gamma$ -glutamil transferază în laptele integral și degresat demonstrează cu o probabilitate de 95% că valorile parametrului  $z$  nu sunt influențate semnificativ de tipul enzimă sau de specia de la care provine laptele;

## Capitolul 8

### Evaluarea inocuității microbiologice a laptelui pe baza parametrilor cinetici specifici unor compuși din lapte

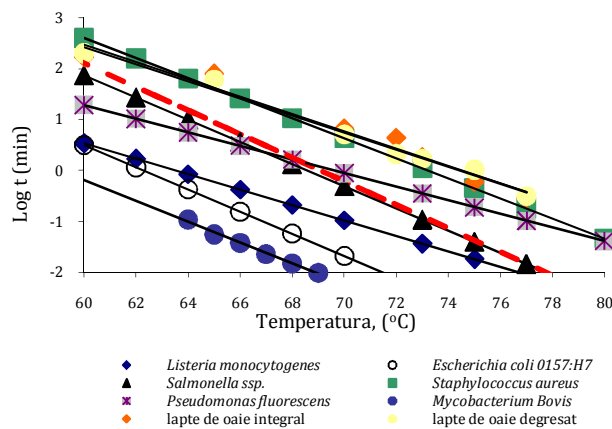
#### 8.4 $\gamma$ -glutamil transferaza și siguranța microbiologică

Acest studiu a arătat că în cinetica de inactivare a GT, parametrii cinetici rezultați nu sunt influențați semnificativ de tipul de lapte sau de conținutul de grăsime al laptelui. Activitatea inițială pe baza căreia au fost construite diagramele de timp și temperatură au fost în laptele integral de  $4025 \pm 294$  U/L (oaie),  $951 \pm 193$  U/L (capră),  $7081 \pm 505$  U/L (vacă) și  $3727 \pm 255$  U/L (oaie),  $437 \pm 78$  U/L (capră) și  $5503 \pm 654$  U/L (vacă) în laptele degresat.

Presupunând că un test negativ este asociat cu reducerea cu 90% din activitatea inițială a GT, rezultă că diferitele combinații temperatură-timp corespunzătoare inactivării acestei enzime sunt suficiente pentru inactivarea microorganismelor cu o termorezistență mai mică sau egală cu cea a lui *P. fluorescens*.

În figura 8.1 este reprezentată diagrama de timp și temperatură pentru zona de pasteurizare ce utilizează GT în aprecierea siguranței microbiologice a laptelui de oaie. Linia roșie punctată în diagramă

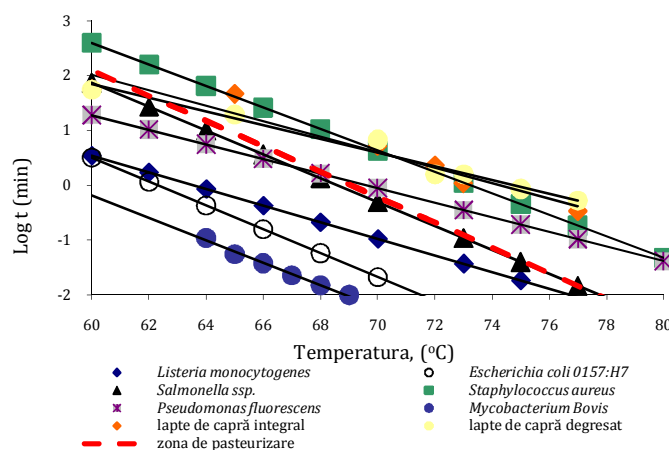
intersectează cele două tratamente termice de pasteurizare prevăzute în legislație și anume: 71,7°C/15 secunde și 62,7°C/30 minute.



**Figura 8.1** Diagrama de timp și temperatură pentru domeniul de pasteurizare: utilizarea testului GT pentru aprecierea siguranței microbiologice a laptelui de oaie

În laptele de oaie atât integral cât și degresat, o reducere de 6 log pentru specia *S. aureus* va fi garantată de un test negativ pentru GT la o temperatură mai mare de 60°C.

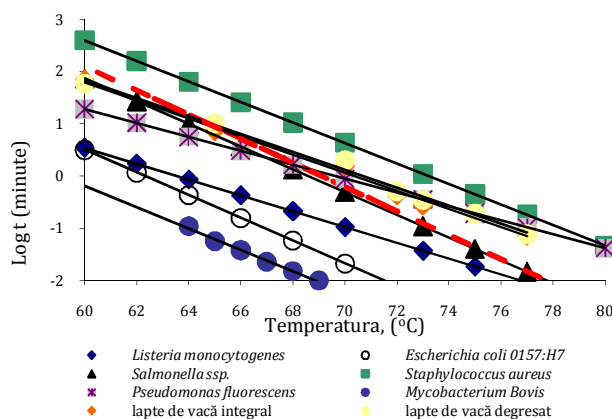
În laptele de capră atât integral cât și degresat (figura 8.2), aplicarea unui tratament termic cuprins între 60-70°C nu asigură prin utilizarea testului GT o reducere de 6 log pentru specia *S. aureus*. Folosirea unui tratament termic la o temperatură mai mare de 70°C va fi garantată de un test negativ pentru GT, asigurând distrugerea microorganismelor ce prezintă o rezistență termică mai mică sau egală cu cea a lui *S. aureus*.



**Figura 8.2** Diagrama de timp și temperatură pentru domeniul de pasteurizare: utilizarea testului GT pentru aprecierea siguranței microbiologice a laptelui de capră

În ceea ce privește laptele de vacă, așa cum se poate observa din figura 8.3, pentru întreg intervalul de temperatură studiat, un test negativ pentru GT nu garantează reducerea cu 6 log a lui

*S.aureus*. Se poate remarca de asemenea, că un grad de inactivare de 90% a lui GT garantează distrugerea termică a *P. fluorescens* doar la o temperatură mai mică de 70°C.



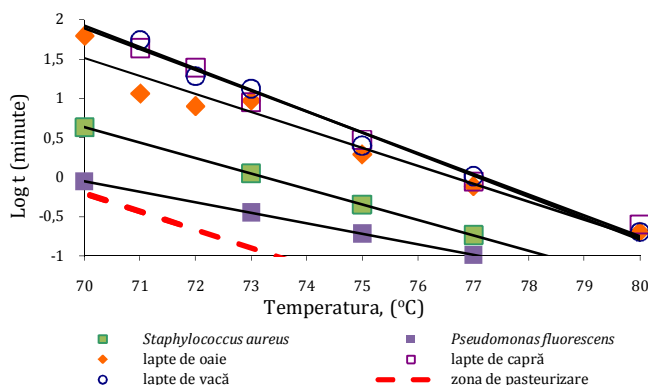
**Figura 8.3** Diagrama de timp și temperatură pentru domeniul de pasteurizare: utilizarea testului GT pentru aprecierea siguranței microbiologice a laptelui de vacă

### 8.5 Lactoperoxidaza și siguranța microbiologică

Deși unele studii au recomandat lactoperoxidaza (LP) drept indicator ce poate fi utilizat pentru identificarea laptelui pasteurizat la temperatură înaltă (Lorenzen și al., 2010), în prezent nu există o reglementare în care să fie specificată o valoare limită pentru activitatea reziduală a LP în laptele suprapasteurizat.

La nivelul UE, nu există o legislație aferentă produselor ESL (extended self-life products), laptele ultrapasteurizat fiind un exemplu reprezentativ în acest sens. În cinetica de inactivare a lactoperoxidazei s-a putut observa că există diferențe între laptele provenit de la diferite specii, enzima inactivându-se cel mai rapid în laptele de oaie.

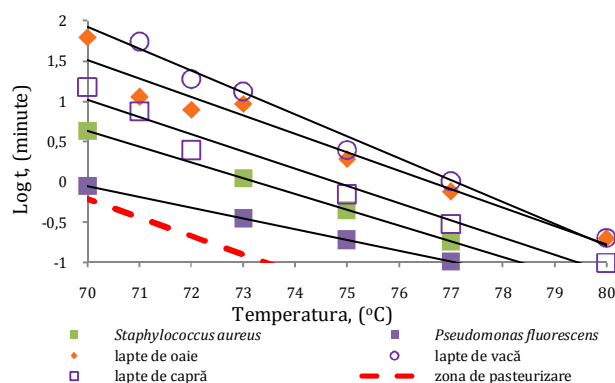
Diagrama de timp și temperatură pentru regiunea de pasteurizare în care este implicată LP este reprezentată în figura 8.4.



**Figura 8.4** Diagrama timp și temperatură pentru domeniul de pasteurizare: utilizarea testului LP pentru aprecierea siguranței microbiologice a laptelui.

O temperatură mai mică sau egală cu 80°C garantează distrugerea microorganismelor cu o rezistență mai mică sau egală cu cea a lui *S. aureus*. Aplicarea unei temperaturi de 80°C timp de 30 de secunde a condus la obținerea unei activități reziduale pentru LP de 0,07% în laptele de capră, 0,12% în laptele de oaie și 0,03% în laptele de vacă.

Hernandez și al. (1990) au identificat în laptele pasteurizat comercial de vacă o activitate mai mică cu 30% față de cea prezentă în laptele crud. Conform diagramei prezentate în figura 8.5, un grad de inactivare de 25% pentru LP corespunde unei activități enzimice de 1,29 U/mL în laptele de oaie, 0,60 U/mL în laptele de capră și 0,72 U/mL în laptele de vacă.



**Figura 8.5** Diagrama timp și temperatură pentru domeniul de pasteurizare: utilizarea testului LP(25% inactivare) pentru aprecierea siguranței microbiologice a laptelui.

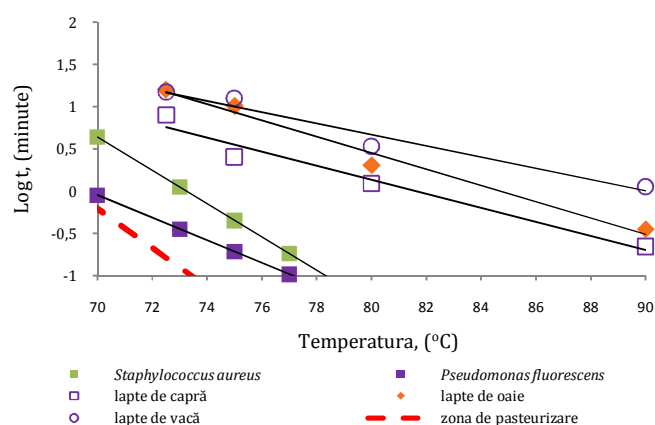
În comparație cu regimul de pasteurizare realizat la 72°C, 15 secunde, activitățile enzimice menționate anterior au fost înregistrate după 2,5 minute (lapte de oaie), 5 minute (lapte de capră) și 12,5 minute (lapte de vacă) de menținere la temperatura de 72°C. De remarcat faptul că LP din laptele de oaie se inactivează mult mai rapid în comparație cu laptele de vacă. În acest studiu, o temperatură mai mică sau egală cu 80°C, aferentă unui grad de inactivare de 25% pentru LP garantează în toate tipurile de lapte analizate distrugerea lui *S. aureus*.

Pasteurizarea înaltă este realizată în cele mai multe cazuri între 85-90°C timp de 15-20 de secunde, prin urmare se poate afirma că LP nu reprezintă un indicator eficient de diferențiere a pasteurizării înalte indiferent de specia de la care provine laptele.

### 8.6 $\beta$ -Lactoglobulina și siguranța microbiologică

Denaturarea  $\beta$ -LG a fost evaluată în raport cu inactivarea microbiană folosind o concentrație medie de 3,12 mg/L în laptele de vacă, 3,33 mg/L în laptele de capră și 7,90 mg/L în laptele de oaie.

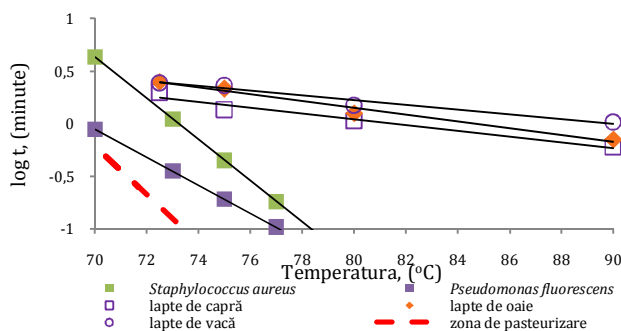
Construirea curbelor de denaturare (figura 8.6) a avut la bază parametrii cinetici corespunzători tratamentului termic efectuat pentru  $\beta$ -LG.



**Figura 8.6** Diagrama de timp și temperatură pentru domeniul de pasteurizare: utilizarea testului  $\beta$ -LG pentru aprecierea siguranței microbiologice a laptelui integral

Condițiile impuse pentru regiunea de pasteurizare se află mult peste limita de distrugere termică a lui *S. aureus*. La temperatura de 72,5°C, timpul de procesare ce corespunde unei reduceri pentru *S. aureus* de 6 log și unei denaturări de 30% pentru  $\beta$ -LG diferă de la o specie de lapte la alta (figura 8.7). Diferența între timpul aferent unei reduceri cu 6 log pentru *S. aureus* și unei denaturări pentru  $\beta$ -LG de 30% este de 0,47 minute în laptele de capră, 3,03 minute în laptele de oaie și 2,85 minute în laptele de vacă.

În prezent, standardele în vigoare existente la nivel european prevăd pentru regimul de pasteurizare realizat la 71,7°C, 15 secunde, o concentrație de  $\beta$ -LG în laptele de vacă mai mare de 2600 mg/L, în timp ce pentru pasteurizarea înaltă, concentrația de  $\beta$ -LG trebuie să fie mai mare de 2000 mg/L. În acest studiu, un grad de denaturare de 30% pentru  $\beta$ -LG la temperatura de 72,5°C corespunde unei concentrații de 2184 mg/L în laptele de vacă, 2331mg/L în laptele de capră și de 5530 mg/L în laptele de oaie.



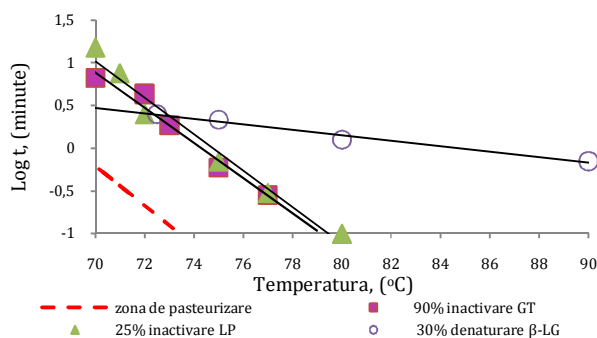
**Figura 8.7** Diagrama de timp și temperatură pentru domeniul de pasteurizare: utilizarea testului  $\beta$ -LG (30% denaturare) pentru aprecierea siguranței microbiologice a laptelui integral

Concentrațiile inițiale de  $\beta$ -LG obținute în acest studiu au fost de 3120 mg/L în laptele de vacă, 3330 mg/L în laptele de capră și 7900 mg/L în laptele de oaie. O concentrație reziduală de 3000 mg/L corespunde unui grad de denaturare de 3,84% în laptele de vacă, 9,91% în laptele de capră și 62,02% în laptele de oaie. Distribuția diferită a unor grupări reactive din laptele de capră și vacă se reflectă asupra vitezei de denaturare a  $\beta$ -LG, așa cum reiese și din figura 8.7. Diferențele mici ce apar în compoziția aminoacizilor pentru tipurile de variante genetice sub care se regăsește  $\beta$ -LG în laptele provenit de la diferite specii de animale conduc la modificări conformaționale, care se reflectă într-un mecanism de denaturare termică și parametri cinetici semnificativ diferiți. În practică, în general, variația genetică este

ignorată deoarece indiferent de varianta genetică, laptele este foarte probabil să conțină concentrații aproximativ egale ale celor două variante genetice A și B (Lyster, 1970).

### 8.7 Indicatorii de timp și temperatură și tratamentele termice aplicate-analiza comparativă

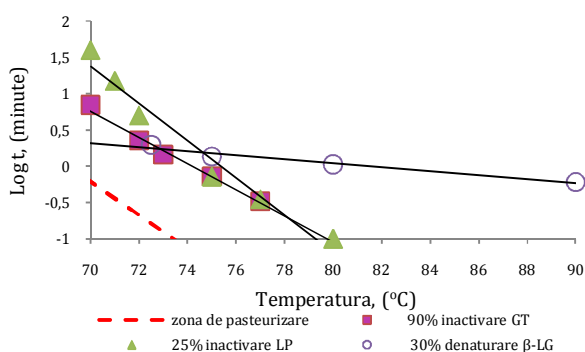
Diagramele construite în figurile 8.8, 8.9, și 8.10, oferă o imagine de ansamblu referitoare la concentrațiile indicatorilor de timp și temperatură prezente în laptele tratat termic provenit de la diferite specii de animale.



**Figura 8.8** Diagrama toleranței de timp și temperatură pentru zona de pasteurizare în laptele integral de oaie

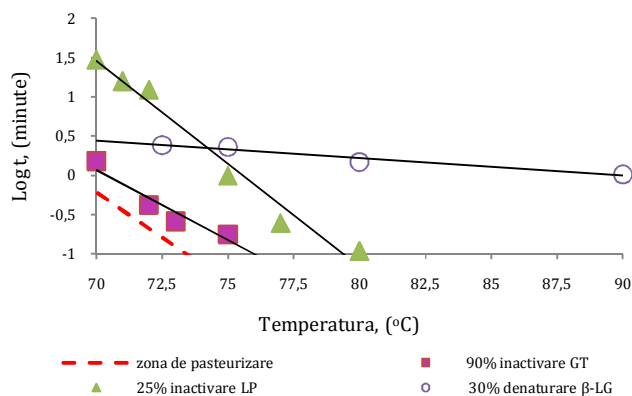
Din diagrame se poate observa că activitatea reziduală de 10% pentru GT și 75% pentru LP în toate tipurile de lapte analizate, delimitează clar domeniul de pasteurizare. De menționat faptul că, inactivarea totală a LP a apărut în urma aplicării unui tratament termic mai mic decât cele aplicate pentru pasteurizarea înaltă.

În laptele de oaie (figura 8.8) curbele de inactivare pentru GT și LP sunt similare, astfel se poate afirma că aceste două enzime pot fi utilizate pentru descrierea limitei inferioare a zonei de pasteurizare HTST. Pentru laptele de capră (figura 8.9), un interval de temperatură mai mic de 75°C realizează o diferențiere clară între GT și LP, astfel GT poate fi utilizată pentru a descrie tratamentele termice aflate între pasteurizarea joasă și cea înaltă.



**Figura 8.9** Diagrama toleranței de timp și temperatură pentru zona de pasteurizare în laptele integral de capră

De remarcă diagrama construită pentru laptele de vacă (figura 8.10), unde domeniul de temperatură aplicat diferențiază evident activitatea reziduală a celor două enzime. Curba ce descrie un grad de inactivare a GT de 90% se apropie de condițiile legale impuse pentru pasteurizarea HTST a laptelui. Curba de inactivare de 25% pentru LP se apropie de limita inferioară ce descrie domeniul pasteurizării înalte care se realizează de obicei la o temperatură mai mare de 80°C, timp de 15-20 secunde.



**Figura 8.10** Diagrama toleranței de timp și temperatură pentru zona de pasteurizare în laptele integral de vacă

În toate tipurile de lapte analizate, domeniul pasteurizării înalte poate fi caracterizat prin utilizarea denaturării cu 30% a β-LG.

## 8.8 Concluzii

Capitolul intitulat Evaluarea inocuității laptelui pe baza parametrilor cinetici specifici unor compuși din lapte a urmărit evaluarea unor indicatori de timp și temperatură pe criterii de siguranță microbiologică. Pentru aceasta s-au utilizat parametrii cinetici calculați pentru γ-glutamil transferază atât în laptele integral cât și degresat, în timp ce pentru lactoperoxidază și β-lactoglobulină doar în laptele integral. Etapa următoare a constat în construirea diagramelor de toleranță de timp și temperatură. Diagramele au permis vizualizarea impactului pe care îl are tratamentul termic în laptele de oaie, capră și vacă și evaluarea criteriilor de siguranță microbiologică.

Concluziile desprinse sunt următoarele:

- O reducere cu 6 log pentru specia *Staphylococcus aureus*, va fi garantată de un test negativ pentru γ-glutamil transferază la o temperatură mai mare de 60°C pentru laptele de oaie și mai mare de 70°C pentru laptele de capră. Pentru laptele de vacă, testul γ-glutamil transferază asigură distrugerea lui *Staphylococcus aureus* la o temperatură mai mică de 70°C;
- În laptele de capră și oaie, un grad de inactivare de 25% pentru lactoperoxidază și 90% pentru γ-glutamil transferază pot fi considerate limite inferioare aferente zonei de pasteurizare înaltă;
- În laptele de vacă, activitatea reziduală de 10% pentru γ-glutamil transferază se apropie de limita inferioară a pasteurizării joase, în timp ce activitatea reziduală de 75% pentru lactoperoxidază se află la limita superioară corespunzătoare zonei de pasteurizare joasă;
- Inactivarea completă a lactoperoxidazei are loc în condiții de tratament termic mai puțin severe față de cele aplicate la pasteurizarea înaltă, astfel, indiferent de specia de la care provine laptele,

---

lactoperoxidaza poate oferi indicii cu privire la momentul trecerii de la o zonă de pasteurizare la alta;

- Un grad de denaturare de 30% pentru  $\beta$ -lactoglobulină caracterizează regiunea corespunzătoare pasteurizării înalte;

În concluzie, caracterizarea indicatorilor de timp și temperatură pentru zona de pasteurizare a oferit informații esențiale ce pot ajuta la diferențierea tipului de tratament termic aplicat, care să garanteze totodată siguranța microbiologică și impactul din punct de vedere calitativ a laptelui indiferent de proveniența acestuia.

## Capitolul 9 Concluzii finale

Ca urmare a compoziției ce furnizează toate elementele nutritive pentru dezvoltarea microorganismelor, laptele proaspăt, indiferent de specia de la care provine, trebuie tratat termic. Acest lucru se datorează ușurinței cu care poate fi contaminat, dacă nu sunt asigurate condiții optime de furajare, mulgere, colectare și manipulare a laptelui etc.

Creșterea exigențelor consumatorilor spre o alimentație sănătoasă a condus la diversificarea produselor lactate de origine nebovină, în special a celor de origine caprină și, implicit, la intensificarea preocupărilor cercetărilor pe plan mondial.

Lucrarea de față a avut ca principal obiectiv caracterizarea indicatorilor intrinseci de timp și temperatură pentru tratamentele termice de pasteurizare care să garanteze siguranța în consum a laptelui de capră și oaie. Cercetările s-au realizat prin studii detaliate de cinetică de denaturare a unor proteine din zer și de inactivare a unor enzime din laptele de oaie, capră și vacă. Indicatorii selectați în acest studiu au fost:  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, fosfataza alcalină,  $\gamma$ -glutamil transferaza și lactoperoxidaza, indicatori care sunt recunoscuți și aplicați pentru stabilirea eficienței tratamentelor termice în laptele de vacă.

Prin corelarea rezultatelor experimentale și a concluziilor elaborate în cadrul fiecărui capitol studiat, s-au evidențiat următoarele concluzii generale:

### 1. $\beta$ -lactoglobulina

- S-a realizat o evaluare a conținutului de proteină în zerul acid prin cromatografie de lichide de înaltă performanță de fază inversă;
- Laptele de oaie a prezentat concentrația cea mai ridicată de 7,28 mg/mL. Pentru laptele de vacă și capră, valorile calculate au fost de 3,27 mg/mL și 3,43 mg/mL;
- Studiul de denaturare termică a vizat domeniul de pasteurizare cuprins între 72,5 și 90°C. S-a constatat un grad redus de denaturare a proteinei la temperatura de 72,5°C, în toate tipurile de lapte analizate. Acest fenomen a fost explicat prin stabilitatea proteinelor și reactivitatea grupărilor SH libere ce sunt implicate în interacțiuni intramoleculare în detrimentul celor intermoleculare;
- Studiile de denaturare efectuate la temperatura de 90°C au demonstrat o susceptibilitate mai ridicată de denaturare a proteinei din laptele de oaie și capră în comparație cu laptele de vacă. Acest comportament a fost justificat de procesul de agregare a moleculelor proteice;



- 
- Parametrii cinetici estimați prin intermediul modelului cinetic de ordinul I au condus la obținerea unor valori pentru energia de activare ce sugerează o conformație moleculară mai compactă a proteinei din laptele de vacă;

### 2. $\alpha$ -lactalbumina

- Cromatogramele rezultate în urma analizei zerului acid au arătat că, laptele de oaie prezintă o concentrație de  $\alpha$ -lactalbumină mai mică, spre deosebire de laptele de capră și vacă;
- În comparație cu  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina este mult mai termostabilă, indiferent de specia de la care provine laptele;
- Din evaluarea comparativă între specii,  $\alpha$ -lactalbumina de origine caprină, la temperatura de 72,5°C timp de 1 minut a prezentat cel mai mic grad de denaturare. Spre deosebire de proteina din laptele de vacă și oaie, același interval de timp aplicat la 90°C a condus la cel mai ridicat grad de denaturare în laptele de capră;
- Analiza Anova unifactorială a evidențiat cu o probabilitate de 95% că valorile constantei vitezelor de denaturare nu sunt influențate semnificativ de tipul de lapte analizat;

### 3. Fosfataza alcalină

- S-a studiat potențialul utilizării unui nou substrat 8 chinolil fosfat asupra cineticii de inactivare termică a fosfatazei alcaline din laptele de vacă, oaie și capră;
- Diferențele în activitatea enzimatică au fost semnificative între laptele provenit de la diferite specii;
- Activitatea fosfatazei alcaline a fost influențată de conținutul de grăsime, aproximativ 40% din activitatea acesteia fiind asociată cu globula de grăsime;
- Pentru calculul parametrilor cinetici s-a utilizat modelul cinetic de ordinul I și modelul Weibull. Ultimul model a fost utilizat pentru prima dată în analiza cineticii de inactivare termică a fosfatazei alcaline;
- Analiza Anova a evidențiat că între parametrii cinetici calculați prin intermediul modelului cinetic de ordinul I și Weibull nu există diferențe semnificative;
- Pe baza parametrilor cinetici estimați, s-a evidențiat rolul protector pe care îl conferă conținutul de grăsime asupra gradului de inactivare termică al enzimei;
- Fosfataza alcalină de origine bovină s-a caracterizat prin termorezistența cea mai ridicată pentru întreg intervalul de temperatură studiat, în timp ce enzima din laptele de oaie a prezentat cea mai scăzută termorezistență;
- Aplicabilitatea substratului 8 chinolil fosfat pentru verificarea eficienței tratamentului de pasteurizare în industria laptelui este limitată datorită valorii obținute pentru limita de detecție. Valoarea obținută este inferioară față de cea impusă de normele europene;

### 4. $\gamma$ -glutamyl transferaza

- Din analiza comparativă a activității enzimatice, laptele de vacă integral a prezentat cea mai ridicată valoare (7081±505 U/L). Activitatea enzimatică obținută în laptele integral de oaie și capră a fost de 1,75 ori și respectiv 7,44 ori mai mică față de cea obținută în laptele de vacă;
- Distribuția activității enzimei în fracțiunea grasă a fost influențată de specia de la care provine laptele. Astfel, în laptele de oaie și vacă, 24 % și respectiv 21 % au fost asociate cu globula de grăsime. În laptele de capră, peste 50% din activitatea enzimatică a fost identificată în smântână;

- 
- Cinetica de inactivare a fost studiată în intervalul 60-77°C. S-au analizat comparativ parametrii cinetici conform modelului cinetic de ordinul I și modelului Weibull, în laptele de oaie și capră în comparație cu laptele de vacă;
  - Cinetica de inactivare termică a enzimei a fost influențată de conținutul de grăsime doar în anumite intervale de temperatură, diferite în funcție de tipul de lapte;
  - Termostabilitatea cea mai ridicată pentru întreg domeniul de temperatură și timp studiat, a fost înregistrată în laptele de capră degresat, cu o valoare calculată pentru coeficientul  $z$  de  $8,02 \pm 0,23^\circ\text{C}$ ;

### **5. Lactoperoxidaza**

- Laptele de oaie a prezentat o valoare pentru activitatea enzimatică de 1720 U/L. Această activitate este mai mare cu 52,90% și respectiv 43,60% față de cea regăsită în laptele de capră și vacă;
- Parametrii cinetici au fost estimați în intervalul de temperatură 70-80°C prin intermediul modelului cinetic de ordinul I și modelului Weibull. Analiza Anova a evidențiat că, pentru un prag de semnificație de 0,05, nu există diferențe semnificative între parametrii cinetici obținuți prin intermediul celor două modele;
- La temperatura de 70°C, termostabilitatea cea mai ridicată a fost înregistrată în laptele de capră, urmat de laptele de vacă și oaie. La temperatura de 80°C, valorile obținute pentru timpul necesar reducerii cu 90% a populației enzimatică au fost similare în toate tipurile de lapte studiate;
- Temperatura necesară reducerii de 10 ori a timpului de reducere decimală a fost cea mai scăzută în laptele de vacă ( $3,49 \pm 0,007$ ) și cea mai ridicată în laptele de oaie ( $4,44 \pm 0,29$ );
- Specia de la care provine laptele cât și temperatura aplicată au influențat semnificativ valorile constantei de inactivare termică, fapt pus în evidență de analiza Anova bifactorială;

### **6. Analiza comparativă a cineticii de denaturare/inactivare termică**

- Activitatea și ponderea în care enzimele studiate sunt prezente în lapte variază de la o specie la alta. Acest lucru a fost evidențiat și din dendograma rezultată în analiza de clusterizare;
- Dintre enzimele studiate,  $\gamma$ -glutamil transferaza a prezentat activitatea cea mai mare;
- Activitatea cea mai ridicată pentru fosfataza alcalină și lactoperoxidază a fost înregistrată la laptele de oaie;
- La cele trei enzime studiate, valorile minime pentru activitățile enzimatică au fost înregistrate în laptele de capră;
- Conținutul de grăsime a prezentat un rol protector în cinetica de inactivare termică a fosfatazei alcaline la temperatura de 60°C;
- Sensibilitatea termică caracterizată prin valoarea parametrului  $z$  a fost cea mai ridicată pentru lactoperoxidază. Valorile lui  $z$  au fost similare pentru fosfataza alcalină și  $\gamma$ -glutamil transferază, indiferent de specia de proveniență a laptelui. La polul opus, s-au situat  $\beta$ -lactoglobulina și  $\alpha$ -lactalbumina, unde domeniul de temperatură studiat a fost descris prin valori ridicate pentru coeficientul  $z$ ;
- Termostabilitatea enzimelor a variat în funcție de tipul de lapte analizat și de temperatura aplicată;

### **7. Evaluarea inocuității microbiologice a laptelui pe baza parametrilor cinetici**

- Evaluarea inocuității laptelui s-a realizat prin reprezentarea diagramelor de timp și temperatură. La construirea acestor diagrame s-au utilizat date cinetice referitoare rezistența/distrugerea

- 
- termică a microorganismelor patogene specifice laptelui cât și parametrii cinetici calculați pentru enzimele studiate;
- Diagramele au fost construite pentru un test negativ ce a presupus inactivarea în proporție de 90% pentru  $\gamma$ -glutamil transferază, 25% pentru lactoperoxidază și 30% pentru  $\beta$ -lactoglobulină. Aceste procente au garantat siguranța microbiologică a laptelui indiferent de specia de la care acesta a provenit;
  - Utilizarea indicatorilor pentru diferențierea tipurilor de tratamente termice aplicate laptelui integral au fost evidențiate în funcție de proveniența acestuia astfel:
    - În laptele de oaie, evoluția indicatorilor  $\gamma$ -glutamil transferază și lactoperoxidază prezintă aceeași pantă. Acest rezultat a sugerat că, în acest tip de lapte, enzimele au caracterizat împreună zona aflată la limita inferioară a pasteurizării înalte;
    - În laptele de capră, testul negativ pentru  $\gamma$ -glutamil transferază a diferențiat tipul de tratament termic aflat între limita superioară a pasteurizării clasice și limita inferioară a pasteurizării înalte pentru o temperatură mai mică sau egală cu 75°C. Un test negativ pentru lactoperoxidază a caracterizat zona aflată la limita inferioară a pasteurizării înalte;
    - În laptele de vacă, un test negativ pentru  $\gamma$ -glutamil transferază s-a aflat la limita ce descrie și garantează siguranța microbiologică a laptelui pentru zona de pasteurizare HTST. Un test negativ pentru lactoperoxidază a diferențiat limita inferioară a pasteurizării înalte;
    - Un test negativ pentru  $\beta$ -lactoglobulină poate fi utilizat pentru caracterizarea domeniului de pasteurizare înaltă în toate tipurile de lapte analizate.

În concluzie, rezultatele obținute, deși au un evident caracter de cercetare fundamentală prezintă și un important caracter aplicativ. Caracterul practic derivă din faptul că, parametrii cinetici calculați pot constitui o bază de date valoroase în vederea optimizării etapelor de tratament termic, de garantare a siguranței în consum a laptelui de origine nebovină și de evaluare a severității tratamentului termic aplicat.

## **Capitolul 10**

### **Contribuții originale și perspective de continuare a studiilor**

Cercetările realizate în corelație cu obiectivele științifice ale tezei de doctorat, s-au evidențiat prin următoarele elemente de originalitate:

- ✓ Au fost realizate simultan studii cinetice de denaturare pentru  $\beta$ -lactoglobulina și  $\alpha$ -lactalbumina din laptele de capră, oaie și vacă;
- ✓ S-a testat eficiența aplicării substratului 8 chinolil fosfat în determinarea activității fosfatazei alcaline din lapte;
- ✓ S-a studiat în detaliu cinetica de inactivare termică a  $\gamma$ -glutamil transferazei pentru laptele de origine nebovină;
- ✓ Au fost puși în evidență și caracterizați tot pentru prima dată parametrii cinetici aferenți lactoperoxidazei din laptele de oaie;
- ✓ Studiile cinetice realizate prin analiza comparativă a două modele matematice a evidențiat potențialul pe care îl prezintă modelul Weibull în caracterizarea cineticii de inactivare termică enzimatică alături de modelul cinetic de ordinul I;

- 
- ✓ Au fost stabilite limitele pentru indicatorii enzimatici și proteici din laptele de origine nebovină care să garanteze siguranța microbiologică a laptelui și implicit să diferențieze tipul de tratament termic aplicat.

Lucrarea de doctorat poate fi continuată prin studierea la nivel industrial a comportamentului termocinetic aferent indicatorilor analizați. De asemenea, cercetările pot lua în considerare influența unor factori precum: variația sezonieră a compoziției asupra cineticii de inactivare a indicatorilor utilizați pentru diferențierea tratamentelor termice aferente industriei laptelui.

Studierea comportamentului cinetic de inactivare a altor enzime din laptele de origine nebovină, cum ar fi: fosfataza acidă, xantin oxidaza, pot constitui o nouă zonă de extindere a studiilor întreprinse în această lucrare de doctorat.

Rezultatele obținute în acest studiu pot prezenta un punct de plecare pentru elaborarea unei propuneri de proiect care să presupună ca obiectiv științific principal descrierea mecanismelor de denaturare a unor proteine de interes alimentar prin aplicarea unor tehnici moderne de investigare. Obiectivele principale ar consta în stabilirea unor corelații între caracteristicile moleculare individuale și transpunerea modificărilor în sistem real.

Se va avea în vedere studiul influenței unor factori de mediu precum: pH, temperatură, tărie ionică, absența sau prezența unor ioni, asupra mecanismelor de inactivare, denaturare a unor proteine și enzime din lapte etc. în sisteme model și real.

Se va lua în considerare aplicarea unor metode experimentale (tehnici cromatografice, de spectroscopie fluorescentă și spectrofotometrice) și metode „in silico” folosind tehnici de modelare moleculară ce vor descrie în detaliu modificările conformaționale.

## Lista lucrărilor științifice publicate în cadrul tezei de doctorat

### 1. Articole/studii publicate în reviste de circulație internațională, ISI

**Dumitrașcu L.,** Stănciuc N., Stanciu S. (2012) The effect of heat treatment on  $\gamma$ -glutamyl transferase activity in non-bovine and bovine milk, A comparative kinetic and thermodynamic investigation, *LWT-Food Science & Technology*, [Factor de impact -2.545, SRI - 1.908](#);

**Dumitrașcu L.,** Stănciuc N., Stanciu S., Râpeanu, G. (2012) Thermal inactivation of lactoperoxidase in goat, sheep and bovine milk – A comparative kinetic and thermodynamic study, *Journal of Food Engineering*, vol. 113(1), 47-52. [Factor de impact -2.414, SRI - 1.85948](#);

**Dumitrașcu, L.,** Moschopoulou, E., Rotaru, G., Aprodu, I., Stanciu, S., Râpeanu, G., Stănciuc, N., (2012). Assessing the heat induced changes in major bovine and non-bovine whey proteins conformation on kinetic and thermodynamic basis, *Small Ruminant Research*, **minor revision**;

Stănciuc N., **Dumitrașcu L.,** Ardelean A., Râpeanu G., Stanciu S, (2011) A Kinetic Study on the Heat-Induced Changes of Whey Proteins Concentrate at Two pH Values, *Food and Bioprocess Technology*, [Factor de impact - 3.703, SRI 2.36275](#);

Stănciuc N., **Dumitrașcu L.,** Râpeanu G., Stanciu S. (2011)  $\gamma$ -Glutamyl transferase inactivation in milk and cream: A comparative kinetic study, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* vol. 12, 56–61, [Factor de impact – 3.030, SRI - 2.33660](#);

---

## 2. Alte lucrări și contribuții științifice

Stănciuc, N., Borda, D., Stanciu, S., Râpeanu, G., **Dumitrașcu, L.** (2011). How to evaluate the efficiency of heat treatment of milk using the enzymes as intrinsic indicators – Experimental results of the national project PN II-ID-PCE-2008-2, *Joint Congress – 9th Slovenian Biochemical Society, 5th Slovenian Microbiological Society with International participation in Association with 3rd CEFORM, 12-15 October, Maribor Slovenia*, oral presentation;

**Dumitrașcu, L.**, Rotaru, G., Stănciuc, N., Stanciu, S. (2011). Lactoperoxidase inactivation in different species of milks – a comparative kinetic study, *2011 EFFoST Annual Meeting, 9-11 noiembrie*, poster presentation;

**Dumitrașcu, L.**, Stănciuc, N., (2011) Evaluation of available lysine and fluorescent compounds in heat-treated milk, *2011 EFFoST Annual Meeting, 9-11 noiembrie*, poster presentation;

**Dumitrașcu L.**, (2011). Fluorescent products formed in milk as markers for the heat treatment: case study on available lysine and fluorescence, *From Food Science to Food Industry, Bridging Education and Research with Engineering and Industry, 6-7 octombrie, 2011 - Galati, România*, oral presentation;

**Dumitrașcu, L.**, Rotaru, G., Stănciuc, N. (2011). Kinetic analysis and thermal inactivation of  $\gamma$ -glutamyl transferase in goat and bovine milk – a comparative study, *4rd International Symposium New Research in Biotechnology, SimpBTH 2011, 10-11 noiembrie, București Romania*, poster presentation.

## 3. Articole în revizie/lucru

**Dumitrașcu, L.**, Rotaru, G., Stănciuc, N. Efficiency of quinoyl phosphate for evaluation of milk alkaline phosphatase from different species, **în lucru**.

## Lista lucrărilor științifice publicate înafara tezei de doctorat

### 1. Cărți și capitole în cărți

Banu, I., Aprodu, I., Nicolau, A., Borda, D., **Dumitrașcu, L.**, Neagu, C., Stoenescu, G., Ionescu, S., (2011) Controlul procesului tehnologic de măcinare, *Ed Galati University Press*, 238 pag;

Borda, D., **Dumitrașcu, L.**, Neagu, C., (2011). Ghid de bune practici pentru furnizorii de grâu, *Ed Galati University Press*, 76 pag.

### 2. Articole publicate în reviste indexate în baze de date internaționale

Pralea D., **Dumitrașcu L.**, Borda D, Stănciuc N., (2011), Functional properties of sodium caseinate hydrolysates as affected by the extent of chymotrypsinolysis, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 17(3), 308-314;

Stanciu, S., Nistor, C., **Dumitrașcu, L.**, Stănciuc, N., (2011) Modern systems of information transmission on Agro & Food supply chain, *International Conference "Risk in Contemporary Economy" ISSN 20670532 XIIth Edition, 2011, Galati, Romania, "Dunarea de Jos" University of Galati*;

Stanciu, S., Nistor, C., **Dumitrașcu, L.**, Stănciuc, N., Metaxa, I., (2011), Research on Fish Consumer Profile Evaluation in Romanian Plain Area, *International Conference "Risk in Contemporary Economy" ISSN 20670532 XIIth Edition, 2011, Galati, Romania, "Dunarea de Jos" University of Galati*;

**Dumitrașcu L.**, Ardelean A., Stănciuc N., (2010) The influence of processing and medium composition on the thiol availability of the whey protein concentrate, *Journal of Faculty of Food Engineering, Stefan cel Mare University-Suceava*, no 3-2010;

Stănciuc N., **Dumitrașcu L.**, Ardelean A., Stanciu S., Râpeanu G., (2010). Heat-induced changes in some technological properties of whey proteins concentrate, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 16(2), 39-43;

---

Pricope L., **Dumitrașcu L.**, Nicolau A., Borda D., Georgescu L., (2009). The influence of saccharin, aspartame, and sorbitol upon the bb12 activity in milk and the characteristics of fermented products, *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology* 34(2), 74-81;

**Dumitrașcu L.**, Borda D., Rotaru G., Lefter R., Rheology of synbiotic cheese type Telemea, *EUROALIMENT, Challenges for Food Science and Food Industry in the Recession Era*, Galați, 9-10 oct 2009.

### Membru în proiecte de cercetare

2009-2013 - Programul operațional regional 2007-2013 - *Reabilitarea, modernizarea, retehnologizarea și reechiparea infrastructurii educaționale universitare în vederea creării, la Galați, a unui pol de educație și de cercetare tehnologică în domeniul științei și ingineriei alimentelor* – RE-SPIA, Axa Prioritară 3, domeniu major de intervenție 3.4., Director de proiect Conf. dr. ing. Daniela Borda;

2010-2012 - Action with multiple Beneficiaries for Cooperation in Higher Education and Vocational Training, EU-US ATLANTIS Programme, Policy Oriented Measure, Agreement no. 2010-2847/001-001-CPT EU-US, *Tuning and Upgrading the Food Safety Education Curricula for BSc (Tu-Be-Safe)* acronim Tu-Be-Safe, Director proiect Conf. dr. ing. Daniela Borda;

2009-2011, Proiect PN II, Program Idei, cod CNCISIS 517, tema 1, Cercetări privind stabilirea unor sisteme analitice de trasabilitate a laptelui și produselor lactate în vederea alinierii produselor românești la cerințele europene de siguranță alimentară; [www.trasilact.ugal.ro](http://www.trasilact.ugal.ro);

2009-2011, Proiect PNII, Program Idei, 52-132/2008 cod CNCISIS, tema *Strategii de reducere a contaminării cu micotoxine în vederea obținerii de produse de panificație cu conținut ridicat de fibre*; [www.fibresig.ugal.ro](http://www.fibresig.ugal.ro);

### Bibliografie selectivă

- 1) Claeys, W., (2003). Intrinsic time temperature integrators for thermal and high pressure processing of milk, PhD Thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium;
- 2) Dumitrașcu L., Stănciuc N., Stanciu S., Râpeanu, G., (2012) Thermal inactivation of lactoperoxidase in goat, sheep and bovine milk – A comparative kinetic and thermodynamic study, *Journal of Food Engineering*, vol. 113(1), 47-52;
- 3) Dumitrașcu L., Stănciuc N., Stanciu S. (2012) The effect of heat treatment on  $\gamma$ -glutamyl transferase activity in non-bovine and bovine milk, A comparative kinetic and thermodynamic investigation, *LWT-Food Science & Technology*, in press;
- 4) Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F., (2005). GlnaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102, (1), 95-105;
- 5) Hernandez, M., van Markwijk B., Vreeman, H., (1990). Isolation and properties of lactoperoxidase from bovine milk. *Netherlands Milk & Dairy Journal* 44, 213-231;
- 6) Kumar, R., Bathia, K.L., (1999). Standardization of method for lactoperoxidase activity in milk. *Lait*, 79, 269-274;
- 7) Lyster, R., (1970). The denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin in heated milk. *Journal of Dairy Research*, 37, 233-243;
- 8) Lorenzen, P.C., Martin, D., Clawin-Rädecker, I., Barth, K., Knappstein, K., (2010). Activities of alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goat's milk in relation to heat treatment, *Small Ruminant Research*, 89(1), 18-23;
- 9) Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I., (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 107-113;

- 
- 10) Manas, P., Pagan. R., (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology* 98, (6), 1387-1399;
  - 11) Moatsou G., Hatzinaki, A., Samolada, M., Anifantakis, E., (2005). Major whey proteins in ovine and caprine acid wheys from indigenous greek breeds, *International Dairy Journal* 15, 123–131;
  - 12) Peleg, M., Cole, M.B., (2000). Estimating the survival of *Clostridium botulinum* spores during heat treatments, *Journal of Food Protection*, 63 (2), 190-195;
  - 13) Pilavtepe, M., (2007). High hydrostatic pressure induced inactivation kinetics of *E. coli* o157:H7 and *S. aureus* in carrot juice and analysis of cell volume change, Phd thesis;
  - 14) Ribeiro, A.C., Ribeiro, S.D.A., (2010). Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research*, 89, 225-233;
  - 15) Slacanac, V., Bozanic A., Judit, H.J., Szabo E., Lucan M., Krstanovic V., (2010). Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk, *International Journal of Dairy Technology*, vol 63, 2, 171-189;
  - 16) Stănciuc, N., (2009). Proteinele laptelui, Ed. Academica, Galați, 273 pag;
  - 17) van Boekel, M.A.J.S., (2008). Kinetic modeling of food quality: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 144–158;
  - 18) Wilińska, A., Bryjak, J., Illeová, V., Polakovič, M., (2007). Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer. *International Dairy Journal*, 17, 579–586;
  - 19) Zehetner, G., Bareuther, C., Henle, T., Klostermeyer, H., (1995). Inactivation kinetics of  $\gamma$ -glutamyl-transferase during the heating of milk, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 201, 336-339.