

**UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI
FACULTATEA DE ȘTIINȚA ȘI INGINERIA ALIMENTELOR
ȘCOALA DOCTORALĂ DE INGINERIE INDUSTRIALĂ**



**CERCETĂRI PRIVIND SUPRAVIEȚUIREA ÎN CONDIȚII DE SIMBIOZĂ
A UNOR TULPINI DE BACTERII PROBIOTICE ÎN PRODUSELE
LACTATE FERMENTATE**

**RESEARCH ON THE SURVIVAL UNDER CONDITIONS OF SYMBIOSIS OF SOME STRAINS OF
PROBIOTIC BACTERIA IN FERMENTED MILK PRODUCTS**

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Coordonatori științifici:

Prof. dr. ing. Gabriela Elena Bahrim

Prof.dr.ing. Costin G.M.

Doctorand: ing. Daniela Paraschiv (Vlad)

Galați

2013

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

CUVÂNT ÎNAINTE	14
I. STUDIU DOCUMENTAR	
IMPLICAȚIILE PRODUSELOR LACTATE FERMENTATE PROBIOTICE ÎN CREȘTEREA CALITĂȚII VIEȚII	
1. Produse lactate fermentate probiotice	23
1.1. Sortimente disponibile comercial	23
1.2. Particularități tehnologice	24
1.3. Implicații asupra sănătății	25
2. Culturi starter de bacterii lactice utilizate pentru fabricarea produselor lactate fermentate	31
2.1. Taxonomie, nomenclatură și proprietăți morfo-fiziologice generale ale bacteriilor utilizate la fabricarea produselor lactate fermentate	32
2.2. Proprietăți biochimice ale bacteriilor utilizate la fabricarea produselor lactate fermentate	36
2.2.1. Metabolismul glucidelor	36
2.2.2. Activitatea proteolitică	38
2.2.3. Activitatea lipolitică	39
2.2.4. Producerea substanțelor de aromă	39
3. Bacterii probiotice și prebiotice utilizate la fabricarea produselor lactate fermentate	41
3.1. Bacterii probiotice, culturi starter comerciale	41
3.1.1. Caracteristici biotehnologice particulare ale culturilor starter comerciale de bacterii probiotice	41
3.1.2. Proprietăți tehnologice și funcționale ale bacteriilor probiotice	42
3.1.3. Aspecte legislative referitoare la calitatea culturilor probiotice comerciale	44
3.1.4. Caracteristici biotehnologice ale culturilor starter comerciale de bacterii probiotice Chr. Hansen	46
3.2. Produse prebiotice	49
3.2.1. Caracterizare generală a prebioticelor	49
3.2.2. Influența prebioticelor asupra dezvoltării bacteriilor probiotice	50
3.2.3. Beneficii pentru sănătate aduse de prebiotice	50
3.2.4. Hrișca, potențialul nutritiv și prebiotic	52
4. Particularități biotehnologice la obținerea produselor lactate fermentate cu culturi starter mezofile	55
4.1. Particularități ale procesului tehnologic de fabricare a produsului Sana	56
4.1.1. Recepția laptelui	56

4.1.2. Omogenizarea laptelui	56
4.1.3. Tratamentul termic al laptelui	56
4.1.4. Inocularea culturii starter.....	57
4.1.5. Termostatarea. Procesul fermentativ	57
4.1.6. Prelucrarea produsului finit	57
4.1.7. Depozitarea produsului finit	58
4.2. Culturi starter utilizate pentru obținerea produsului Sana	58
4.3. Posibilități de diversificare tehnologică și îmbunătățire a valorii nutritive și funcționale a produsului Sana	60
Referințe bibliografice.....	61

II. STUDIU EXPERIMENTAL

5. Selecția tulpinilor de bacterii lactice probiotice pe baza adaptabilității și a stabilității în culturi multiple cu culturi starter mezofile de tip LD, în produse lactate fermentate mezofile de tip Sana.....	69
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

5.1. Introducere.....	70
5.2. Materiale și metode de investigare.....	72
5.2.1. Materiale	72
5.2.2. Metode de investigare	78
5.3. Rezultate și discuții	84
5.3.1. Multiplicarea tulpinilor probiotice în culturi multiple în combinație cu cultura mezofilă Flora Danica.....	84
5.3.2. Menținerea viabilității bacteriilor probiotice în produse lactate mezofile, fermentate cu culturi multiple, în timpul conservării	89
5.4. Concluzii parțiale.....	93
Referințe bibliografice.....	94

6. Optimizarea condițiilor biotehnologice de obținere a produselor lactate probiotice de tip Sana utilizând culturi starter multiple	96
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

6.1. Introducere.....	97
6.2. Materiale și metode de investigare și analiză statistică.....	98
6.2.1. Materiale	98
6.2.2. Metode de investigare și de prelucrare statistică a datelor experimentale	99
6.3. Rezultate și discuții	104
6.3.1. Identificarea unor factori cu influență semnificativă asupra funcționalității și a viabilității bacteriilor probiotice în culturi starter multiple.....	104
6.3.2. Optimizarea funcționalității și a stabilității bacteriilor probiotice LA-5® și <i>L. casei</i> -431® în culturi multiple, utilizând metoda analizei suprafeței de răspuns	113
6.3.3. Validarea condițiilor biotehnologice optime de obținere produsului lactat probiotic utilizând culturi starter multiple cu bacterii mezofile	141
6.4. Concluzii parțiale.....	144
Referințe bibliografice.....	146

7. Experimente la nivel industrial de obținere de noi produse lactate fermentate cu tulpini de bacterii probiotice, în condiții favorabile bacteriilor mezofile.....	149
7.1. Obținerea la nivel industrial și caracterizarea microbiologică a produselor lactate fermentate noi formulate	149
7.1.1. Introducere	149
7.1.2. Materiale și metode de analiză	149
7.1.3. Rezultate și discuții.....	154
7.1.4. Concluzii parțiale.....	160
7.2. Evaluarea prin spectrometrie de absorbție în infraroșu a compoziției produselor lactate funcționale fermentate, obținute la nivel industrial în condiții favorabile bacteriilor mezofile, cu culturi probiotice multiple și adaos de făină de hrișcă	161
7.2.1. Introducere	161
7.2.2. Materiale și metode de analiză	162
7.2.3. Rezultate și discuții.....	166
7.2.4. Concluzii parțiale.....	172
7.3. Evaluarea transformărilor chimice și senzoriale ale produselor lactate funcționale fermentate, obținute la nivel industrial în condiții favorabile bacteriilor mezofile, cu culturi probiotice multiple și adaos de făină de hrișcă	174
7.3.1. Introducere	174
7.3.2. Materiale și metode de analiză	180
7.3.3. Rezultate și discuții.....	188
7.3.4. Concluzii parțiale.....	212
Referințe bibliografice.....	214
8. Concluzii finale	216
9. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective.....	220
10. Diseminarea rezultatelor cercetărilor.....	222
Anexe	258

CUVÂNT ÎNAINTE

Alimentația are ca principală funcție asigurarea nevoilor metabolice ale organismului, dar este responsabilă și pentru asigurarea stării de bine și a celei de satisfacție senzorială a consumatorului. În plus, alimentele trebuie să contribuie și la asigurarea și protecția sănătății și de aceea se promovează un concept în plină dezvoltare și efervescență, cel al alimentelor funcționale (Costin 1999). Dezvoltarea fără precedent a alimentelor funcționale reprezintă un răspuns la tendințele globale de consum și la volumul mare de date de cercetare științifică care demonstrează implicarea anumitor ingrediente în menținerea sănătății.

O introspectivă în megatendințele globale ale consumatorilor (www.prnewswire.com) a rezultat în observația că pe primele locuri în ceea ce privește preocupările și interesele populației se situează:

- Pe locul 1: Sănătatea și starea de bine, tradusă prin „vreau să mă simt bine în corpul meu”.
- Pe locul 2: Produsele naturale, indicând o tendință de întoarcere la origini și la produsele de bază.
- Pe locul 3: Convenabilitatea, tradusă prin acces fără efort la produsele dorite.
- Pe locul 4: Schimbarea, în acest sens așteptările consumatorilor îndreptându-se spre produse sănătoase pentru ei și planetă, „doresc să mă simt bine cu alegerile facute”.

Un studiu intitulat Functional Foods/Foods for Health Consumer Trending Survey (IFIC) realizat în anul 2009 demonstrează că marea majoritate a consumatorilor consideră că cel mai mare impact asupra sănătății îl au alimentația și nutriția (Figura 1), pe locul al doilea situându-se exercițiile fizice, iar pe locul trei istoricul de sănătate al familiei (moștenirea genetică a individului).

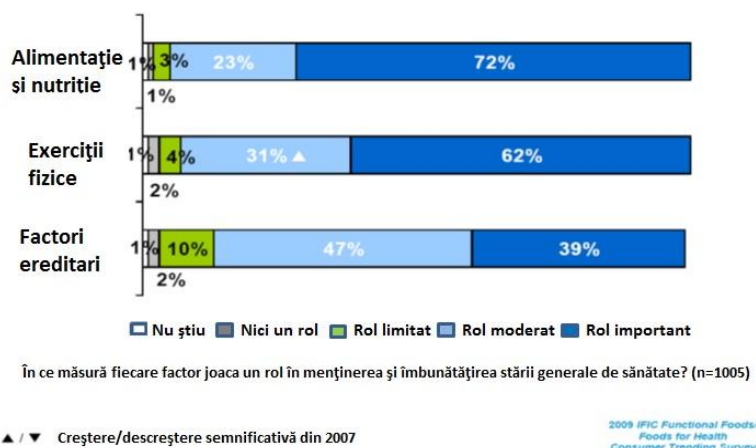


Figura 1.1. Impactul principalilor factori cu rol în menținerea și îmbunătățirea sănătății

Având în vedere că alimentația și nutriția ocupă primul loc în opinia consumatorilor în ceea ce privește impactul asupra sănătății, s-au studiat tendințele pieței globale legate de ingredientele comerciale, cu impact asupra sănătății. Cele 10 tendințe cheie pe piața ingredientelor cu

beneficii asupra sănătății, conform unui studiu de piață realizat și publicat în Revista „*New Nutrition Business*”, în August 2011, sunt în ordine:

1. Sănătatea digestivă – prezintă cea mai mare oportunitate pentru creștere
2. Energia – apar oportunități pentru noi aplicații
3. Să se simtă beneficiul – este cel mai puternic mesaj de marketing
4. Fructele – reprezintă viitorul în alimentație și sănătate
5. Controlul greutății
6. Sănătoși în mod natural și ultra-convenabil
7. Ambalarea inovativă și produsele premium
8. Antioxidanții – populari dar cu viitor incert
9. Regulatori ai imunității
10. Oaze și mobilitate

Plecând de la aceste considerente, putem concluziona faptul că produsele funcționale, în special cele cu efecte asupra sănătății gastro-intestinale și a imunității, prezintă un potențial imens și se găsesc în topul subiectelor de studiat și de dezvoltat la nivel global.

Ingredientele funcționale cu efecte asupra sănătății gastro-intestinale și a imunității sunt reprezentate într-o proporție de peste 90% de către bacteriile probiotice și de produsele prebiotice.

Dintre produsele funcționale existente pe piață, cea mai importantă categorie este reprezentată de produsele lactate fermentate, care sunt și cel mai bun vector pentru bacteriile probiotice și pentru ingredientele prebiotice.

Alimentele probiotice sunt produse alimentare ce conțin microorganisme probiotice într-o proporție suficientă pentru a produce efecte probiotice dacă aceste produse sunt ingerate. În acest context, supraviețuirea bacteriilor probiotice în matricea alimentară este esențială.

Iaurturile obținute prin fermentare cu bacterii probiotice au fost studiate începând cu mult timp în urmă și există documentație extinsă referitoare la această aplicație. Dar sunt foarte puține studii care s-au făcut vis-a-vis de utilizarea probioticelor în alte aplicații din industria laptelui sau din industria alimentară.

Teza de doctorat „**Cercetări privind supraviețuirea în condiții de simbioză a unor tulpini de bacterii probiotice în produsele lactate fermentate**” contribuie la dezvoltarea cunoașterii în domeniu prin obținerea unui produs lactat probiotic nou și optimizarea procesului biotehnologic aferent, astfel încât să se obțină un produs finit cu o viabilitate ridicată a bacteriilor probiotice pe durata de valabilitate a produsului probiotic. Deoarece în România producția de lactate fermentate este dominată de produsele lactate “mezofile” precum sana, chefir, lapte bătut, și având în vedere dorința consumatorilor de diversificare a aplicațiilor probiotice și pe alte produse în afară de iaurt, studiile au vizat dezvoltarea unui sortiment probiotic nou derivat de la produsul foarte popular Sana. Noutatea constă și în faptul că există foarte puține studii internaționale referitoare la comportamentul și viabilitatea bacteriilor probiotice, uzual folosite în combinații cu bacterii lactice termofile, în amestec cu un „cocktail” de bacterii mezofile precum: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*.

Activitățile de cercetare din cadrul tezei au fost realizate cu ajutorul infrastructurii și a resurselor intelectuale din cadrul următoarelor instituții:

- Centrul Integrat de Cercetare, expertiză și transfer tehnologic (BioAliment-TehnIA) (www.bioaliment.ugal.ro), din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea Dunărea de Jos din Galați.
- Stația de Cercetare și Tehnologie Aplicată a companiei Chr. Hansen A/S, Danemarca .
- Fabrica de produse lactate SC Almera International SRL, Bacău.

Realizarea tezei de doctorat aduce un plus important de valoare în extinderea competențelor profesional științifice ale autoarei, drd. ing. Daniela Paraschiv, în prezent director general la Chr. Hansen Romania, cu importanță deosebită pentru promovarea utilizării adecvate a aditivilor și ingredientelor alimentare în obținerea de alimente sănătoase cu impact asupra creșterii calității vieții.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat este compusă din 266 pagini și este structurată în două părți, respectiv: **I. STUDIU DOCUMENTAR** care este compus din 4 capitole și **II. PARTEA EXPERIMENTALĂ** structurată în 3 capitole.

I. STUDIU DOCUMENTAR intitulat „**Implicațiile produselor lactate fermentate probiotice în creșterea calității vieții**” prezintă stadiul actual al cunoașterii și al cercetărilor în domeniul produselor lactate probiotice și prebiotice. Cele patru capitole ce compun această parte a tezei sunt:

Capitolul 1, intitulat *Produse lactate fermentate probiotice* descrie culturile starter probiotice disponibile comercial, particularitățile lor tehnologice și implicațiile asupra sănătății.

Capitolul 2, intitulat *Culturi starter de bacterii lactice utilizate pentru fabricarea produselor lactate fermentate* se bazează pe date din literatura de specialitate și prezintă taxonomia, nomenclatura și proprietățile morfo-fiziologice și biochimice ale bacteriilor utilizate la fabricarea produselor lactate fermentate. În acest capitol sunt, de asemenea, prezentate metabolismul glucidelor, activitatea proteolitică și lipolitică și mecanismul producerii substanțelor de aromă specifice bacteriilor lactice.

Capitolul 3, intitulat *Bacterii probiotice și prebiotice utilizate la fabricarea produselor lactate fermentate* descrie culturile starter comerciale de bacterii probiotice, cu caracteristicile lor biotehnologice, proprietățile funcționale particulare și aspecte legislative de actualitate. Sunt incluse date din literatura de specialitate referitoare la produsele prebiotice, influența lor asupra dezvoltării bacteriilor probiotice și beneficiile pentru sănătate specifice și, de asemenea, este descrisă hrîșca și potențialul ei nutritiv și prebiotic.

Capitolul 4, intitulat *Particularități biotehnologice la obținerea produselor lactate fermentate cu culturi starter mezofile* prezintă procesul tehnologic de fabricare a produsului Sana, culturile starter utilizate și posibilitățile de diversificare tehnologică și îmbunătățire a valorii nutritive și funcționale a acestui produs.

II. PARTEA EXPERIMENTALĂ prezintă rezultatele investigațiilor realizate pe parcursul cercetării aferente studiului doctoral. Această parte cuprinde trei capitole după cum urmează:

Capitolul 5, intitulat *Selecția tulpinilor de bacterii lactice probiotice pe baza adaptabilității și a stabilității în culturi multiple cu culturi starter mezofile de tip LD, în produse lactate fermentate mezofile de tip Sana* prezintă studii în care a fost evaluat comportamentul fiziologic al probioticelor LA-5®, L. casei 431® și BB-12®, în culturi multiple cu Flora Danica, cultură mezofilă aromatizantă de tip LD, utilizate pentru obținerea produsului fermentat de tip Sana. Pentru tulpinile probiotice amintite mai sus s-au studiat capacitatea de multiplicare și stabilitatea (viabilitatea) în timpul conservării, pe perioada termenului de valabilitate.

Capitolul 6, *Optimizarea condițiilor biotehnologice de obținere a produselor lactate probiotice de tip Sana utilizând culturi starter multiple* prezintă date cu valoare de cercetare fundamentală și aplicativă care au vizat identificarea factorilor biotehnologici esențiali care influențează comportamentul biotehnologic și viabilitatea tulpinilor probiotice *Lactobacillus acidophilus* La-5® și *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* L.casei-431®, în condițiile fermentative specifice obținerii produselor lactate fermentate de tip Sana, cu adaos de făină de hrișcă cu rol prebiotic, cu culturi multiple cu cultura mezofilă Flora Danica, și optimizarea condițiilor biotehnologice, având ca țintă principală menținerea viabilității bacteriilor probiotice până în momentul consumului, precum și *in vivo*.

Capitolul 7, intitulat *Experimente la nivel industrial de obținere de noi produse lactate fermentate cu bacterii probiotice în condiții favorabile bacteriilor mezofile*, prezintă caracteristicile tehnologice, nutritive, funcționale și senzoriale ale produselor lactate fermentate noi formulate de tip Sana, utilizand tulpini probiotice în culturi multiple și adaos de prebiotic făină de hrișcă, produse ce au fost obținute industrial la S.C. Almera International S.R.L. Bacău. S-a testat gradul de multiplicare, stabilitatea și viabilitatea tulpinilor probiotice, *in vitro* (în timpul depozitării în condiții de refrigerare). Pentru identificarea compușilor bioactivi ce dau funcționalitate produselor lactate fermentate fabricate s-au utilizat gaz cromatografia cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS) și spectrometria de absorbție în infraroșu (FTIR).

De asemenea, s-a urmărit stabilitatea biochimică și microbiologică a noilor produse pe durata termenului de valabilitate, depozitate fiind în condiții de piață la 4°C, utilizându-se metode moderne de analiză instrumentală și senzorială.

Capitolul 8, intitulat *Concluzii finale* sintetizează concluziile generale rezultate în urma studiilor realizate.

Capitolul 9, intitulat *Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective* prezintă contribuțiile tezei de doctorat la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspectivele continuării studiului.

Capitolul 10, intitulat *Diseminarea rezultatelor cercetărilor* prezintă modalitățile de diseminare ale rezultatelor obținute de-a lungul cercetărilor prin publicare în reviste cotate ISI și reviste indexate în baze de date internaționale și prezentări în cadrul unor seminarii internaționale.

OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE CERCETĂRII

Studiile realizate pe parcursul stagiului doctoral au vizat următoarele obiective științifice:

- ✓ Selecția unor tulpini de bacterii probiotice, dintre culturile starter comercializate de compania Chr. Hansen (La-5®, BB-12®, L.casei-431®), capabile să aibă cel mai mare grad de viabilitate, în timpul fermentării și al depozitării în condiții de refrigerare, în produsele de tip Sana fermentate cu culturi multiple conținând tulpini probiotice și culturi mezofile de tip LD.
- ✓ Optimizarea condițiilor biotehnologice de obținere a produsului Sana cu tulpini probiotice și adaos de prebiotice (făină de hrișcă) și validarea parametrilor optimi de proces.
- ✓ Obținerea produsului la nivel industrial și caracterizarea fizico-chimică și microbiologică a produselor lactate fermentate noi formulate de tip Sana, obținute cu culturi multiple, cu tulpini de bacterii lactice probiotice și făină de hrișcă.

DESCRIEREA EXPERIMENTELOR

5. Selecția tulpinilor de bacterii lactice probiotice pe baza adaptabilității și a stabilității în culturi multiple cu culturi starter mezofile de tip LD, în produse lactate fermentate mezofile de tip Sana

Scopul acestui studiu a fost evaluarea comportamentului fiziologic al tulpinilor probiotice comercializate de compania Chr. Hansen, LA-5®, *L. casei 431*® și BB-12®, în culturi mixte cu Flora Danica, o cultură mezofilă aromatizantă de tip LD, utilizată pentru obținerea produsului fermentat de tip Sana.

5.2. Materiale și metode de investigare

5.2.1. Materiale

Culturi starter

1) Culturi starter probiotice:

- *Lactobacillus acidophilus* (LA-5®) (10^{11} ufc/g)
- *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* (L. casei 431®) ($0,5 \times 10^{11}$ ufc/g)
- *Bifidobacterium bifidus* (BB-12®) (10^{11} ufc/g)

2) Cultura mezofilă de bacterii lactice Flora Danica, conținând tulpinile:

- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*
- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*

În studiile realizate, pentru culturile starter s-au utilizat următoarele coduri:

- **FD** - cultura Flora Danica
- **LA** – cultura LA-5®
- **LC** - cultura *L. casei* 431®
- **BB** – cultura BB-12®

Medii de cultură

- MRS agar

Reactivi

- Apa peptonată –soluție 0,1% peptonă în apă distilată; Antibiotice: clindamicina (Sigma), ciprofloxacina (Bayer), clorhidrat de L-cisteină, mupirocina; Etanol 90%; Anaerocult® (Merck)

Echipamente

- pH-metru Portamess 911®, Elveția; plăci Petri, eprubete; Vortex V1 PLUS; Anaerostat

5.2.2. Metode de investigare

Pregătirea probelor

Culturile liofilizate au fost reactivitate în lapte UHT cu 3,5% grăsime (Prodlacta Braşov, România) cu termostatare timp de 15 minute, la temperatura de 30°C, în condiții aerobe. Numărul de celule din inocul a fost de 9 log ufc/mL, pentru toate tipurile de culturi, combinate în proporții egale. Inoculul a fost obținut prin combinarea culturii mezofile Flora Danica cu culturi de bacterii probiotice în culturi mixte, după cum urmează: LA+FD, LC+FD și BB+FD, LA+FD+LC, LC+FD+BB, LA+FD+BB și LA+FD+LC+BB. După inoculare, probele au fost termostatate la temperatura de 37°C, până la pH de 4,6. Măsurarea pH-ului din fiecare probă a fost efectuată cu un pH-metru (Portamess 911®, Elveția), sterilizat periodic cu etanol 90%. După fermentare probele au fost depozitate la temperatura de 4°C, timp de 21 de zile, această durată reprezentând termenul standard de valabilitate al produselor lactate. Viabilitatea celulelor a fost analizată la sfârșitul fermentării, după 7, 14 și 21 zile.

Numărarea selectivă a bacteriilor probiotice și a bacteriilor lactice mezofile

Pentru numărarea selectivă a bacteriilor probiotice, s-a utilizat metoda indirectă culturală de numărare, prin cultivarea în medii MRS agar suplimentate cu antibiotice specifice pentru a asigura selectivitatea.

Pentru numărarea coloniilor dezvoltate, după termostatare, s-au ales plăcile Petri care au conținut între 15 și 300 de colonii, iar numărul de celule, exprimat în ufc/mL, s-a calculat folosind următoarea formulă:

$$\text{ufc/mL} = \Sigma n / (x_1 + 0,1 \cdot x_2) \cdot k$$

unde: Σn - reprezintă suma coloniilor numărate din toate plăcile Petri ce au conținut un număr mai mic de 300 de colonii.

X_1 - reprezintă numărul de plăci Petri din prima diluție din care s-a făcut numărarea;

X_2 - reprezintă numărul de plăci Petri din a doua diluție din care s-a făcut numărarea;

K - coeficient de diluție corespunzător primei diluții din care s-a făcut numărarea

5.3. Rezultate și discuții

5.3.1. Multiplicarea tulpinilor probiotice în culturi multiple în combinație cu cultura mezofilă Flora Danica

Fermentația produselor lactate se oprește atunci când pH-ul atinge valoarea de 4,6. Monitorizarea pH-ului s-a efectuat din oră în oră, timp de 4 ore, pe toată durata procesului fermentativ.

Viabilitatea tulpinilor probiotice a fost determinată inițial, după inoculare și la sfârșitul fermentației, după 4 ore de termostatare la 37°C.

În cazul probelor în care tulpina probiotică LA-5® a fost monitorizată, evoluția pH-ului în timpul fermentației a fost variabilă. Scăderea mai rapidă a pH-ului în timpul fermentării a fost înregistrată în probele în care combinațiile de culturi starter au fost LA-5® + Flora Danica (LA+FD) și LA-5® în combinație cu *L. casei* 431® și Flora Danica (LA+FD+LC) (figura 5.4.). Cea mai lentă scădere a pH-ului a fost înregistrată în probele cu cultura probiotică BB-12®, în culturi multiple, în combinațiile LA+FD+LC+BB și LA+FD+BB.

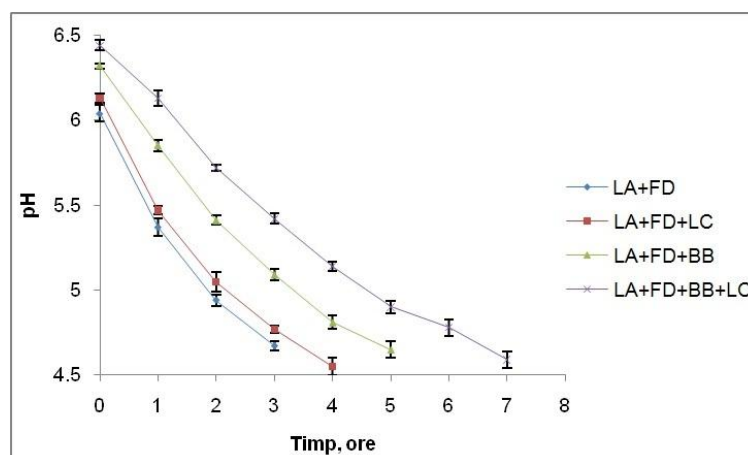


Figura 5.4. Evoluția pH-ului în produsele lactate, în timpul fermentării cu combinații de tulpini probiotice; monitorizarea culturii LA-5® (FD - Flora Danica, LA - LA-5®, LC - *L. casei* 431®, BB - BB-12®)

În probele în care cultura *L. casei* 431® a fost monitorizată, reducerea pH-ului la valoarea de 4,6 a fost obținută în 4 ore, în cazul utilizării combinațiilor de culturi LC+FD, LC+FD+LA și LC+FD+BB+LA (figura 5.5.).

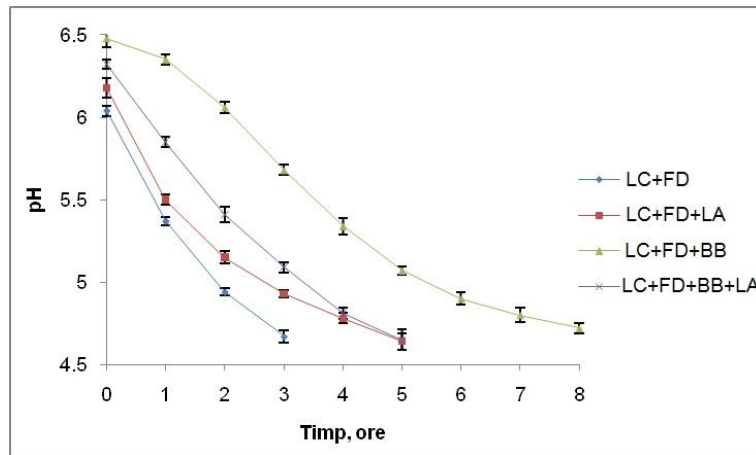


Figura 5.5. Evoluția pH-ului în produsele lactate, în timpul fermentării cu combinații de tulpinii probiotice; monitorizarea culturii *L. casei* 431® (**FD** - Flora Danica, **LA** - LA-5®, **LC** - *L. casei* 431®, **BB** - BB-12®)

Evaluarea comportamentului culturii BB-12® ca probiotic starter, a demonstrat că valoarea pH-ului de 4,6 a fost atinsă în 4 ore de fermentare în combinațiile de culturi BB+FD+LA și BB+FD+LC (figura 5.6.). Cea mai scăzută reducere a pH-ului a fost înregistrată pentru combinația BB-12® și Flora Danica (BB+FD).

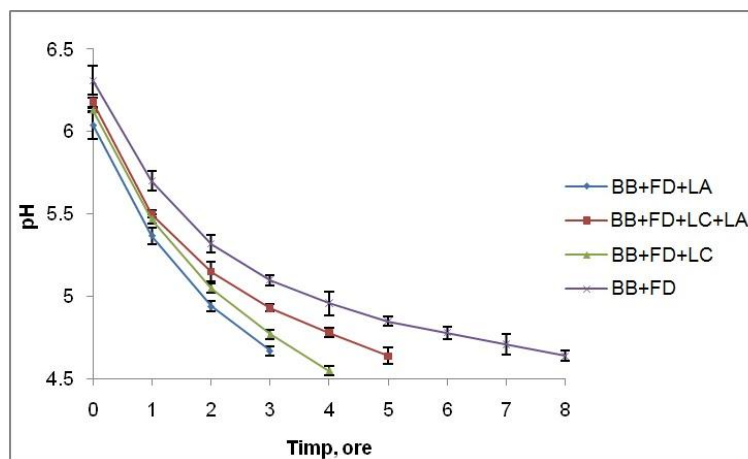


Figura 5.6. Evoluția pH-ului în produsele lactate, în timpul fermentării cu combinații de tulpinii probiotice; monitorizarea culturii BB-12® (**FD** - Flora Danica, **LA** - LA-5®, **LC** - *L. casei* 431®, **BB** - BB-12®)

Creșterea bacteriilor este corelată cu evoluția pH-ului, multe tulpini probiotice fiind influențate negativ de scăderea pH-ului sub valoarea de 5,0.

Viabilitatea culturilor probiotice la sfârșitul perioadei de fermentare, comparativ cu inoculul, a variat pentru toate tulpinile testate în funcție de culturile de probiotice și de combinațiile utilizate. Vitezele de multiplicare a bacteriilor probiotice în culturile starter multiple sunt prezentate în figurile 5.7. ÷ 5.9.

Culturile LA-5® și *L. casei* 431® au înregistrat cea mai mare viteză de multiplicare, respectiv peste 1 log ufc/mL, comparativ cu inoculul, după 4 ore de fermentare în combinația LA+LC+FD (figurile 5.7. și 5.8.).

Cea mai bună combinație în care concentrația de celule a culturii BB-12® a fost ridicată la sfârșitul perioadei de fermentare, comparativ cu inoculul, a fost BB+FD (figura 5.9).

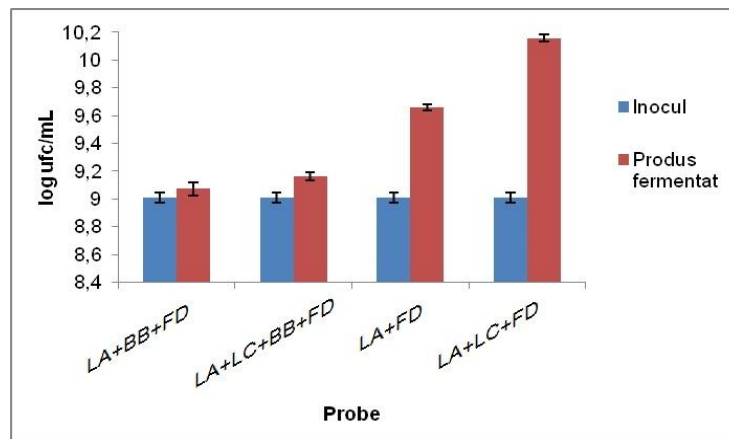


Figura 5.7. Viabilitatea culturii LA-5® (LA) la sfârșitul perioadei de fermentare comparativ cu inoculul, prin utilizarea culturilor starter multiple (FD - Flora Danica, LA - LA-5®, LC - *L. casei* 431®, BB - BB-12®)

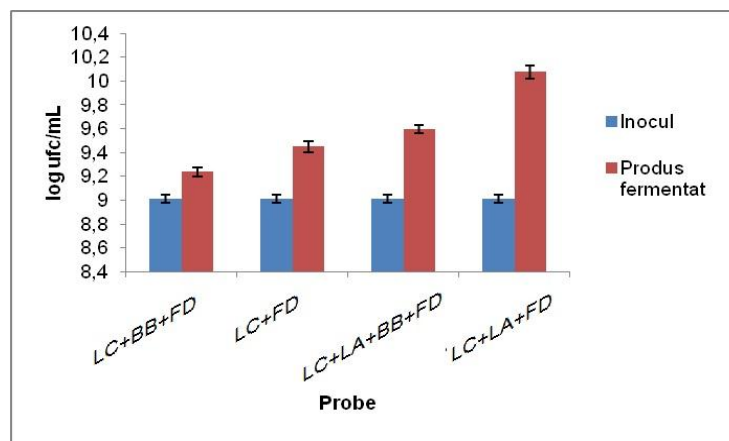


Figura 5.8. Viabilitatea culturii *L. casei* 431® (LC) la sfârșitul perioadei de fermentare comparativ cu inoculul, prin utilizarea culturilor starter multiple (FD - Flora Danica, LA - LA-5®, LC - *L. casei* 431®, BB - BB-12®)

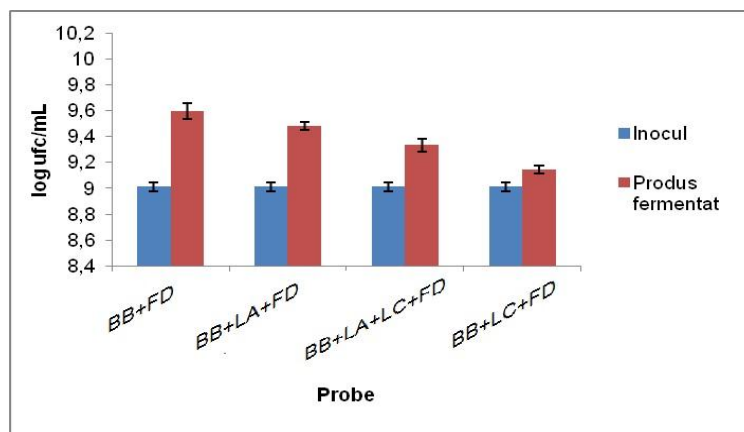


Figura 5.9. Viabilitatea culturii BB-12® (BB) la sfârșitul perioadei de fermentare comparativ inoculul, prin utilizarea culturilor starter multiple (FD - Flora Danica, LA - LA-5®, LC - *L. casei* 431®, BB - BB-12®)

Cele mai bune viteze de multiplicare în culturi multiple, atât pentru LA-5® cât și pentru *L. casei*-431® au fost înregistrate în combinația de culturi LA+LC+FD. Această combinație pare a fi cea mai convenabilă pentru a fi utilizată în obținerea de produse fermentate cu culturi probiotice, având în vedere timpul de fermentare, corelat cu reducerea pH-ului și concentrația de celule la sfârșitul fermentării.

5.3.2. Menținerea viabilității bacteriilor probiotice în produse lactate mezofile, fermentate cu culturi multiple, în timpul conservării

Monitorizarea viabilității celor trei tulpini de probiotice, LA-5®, *L. casei* 431® și BB-12®, utilizate în mai multe combinații de culturi mixte cu cultura mezofilă Flora Danica, timp de 3 săptămâni, prin depozitarea produselor fermentate în condiții de refrigerare (4°C), a indicat diferențe în capacitatea de supraviețuire a tulpinilor de probiotice testate în acest studiu.

Cultura probiotică LA-5® și-a menținut constantă viabilitatea pe durata a trei săptămâni de conservare prin refrigerare la temperatura de 4°C. Cea mai pregnantă scădere a viabilității, cu aproximativ 3 log ufc/mL, s-a înregistrat în combinația de culturi LA+LC+FD (figura 5.10).

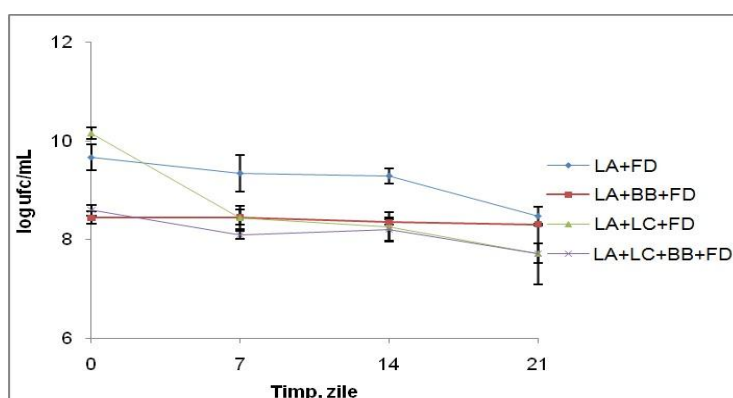


Figura 5.10. Viabilitatea culturii probiotice LA-5® (LA) în produsele fermentate, pe perioada conservării în condiții de refrigerare, timp de 21 de zile (FD - Flora Danica, LA - LA-5®, LC - *L. casei* 431®, BB - BB-12®)

Cea mai bună combinație de culturi pentru a asigura stabilitatea culturii starter *L. casei* 431® în timpul depozitării la 4°C, după cum se observă din figura 5.11., se obține atunci când această cultură probiotică s-a utilizat în combinațiile LC+FD și, respectiv, LC+BB+FD (figura 5.11.).

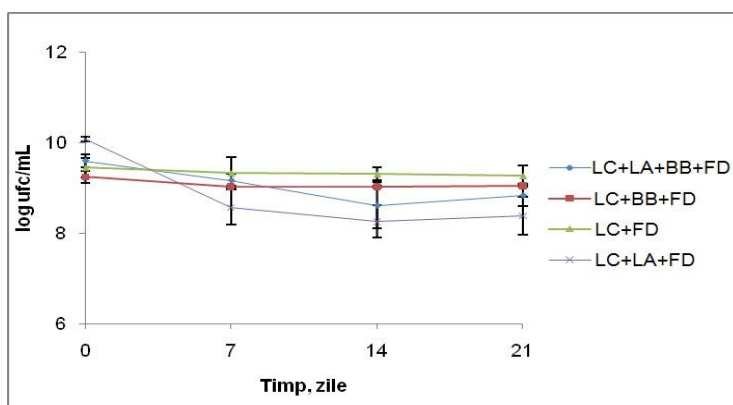


Figura 5.11. Viabilitatea culturii probiotice *L. casei* 431® (LC) în produsele fermentate, pe perioada conservării în condiții de refrigerare, timp de 21 de zile (FD - Flora Danica, LA - LA-5®, LC - *L. casei* 431®, BB - BB-12®)

În prezența culturii LA-5® este afectată negativ supraviețuirea *L. casei* 431® pe perioada conservării produsului fermentat. Astfel, în combinația de culturi LC+LA+FD, pornind de la un număr inițial de celule viabile de 10 log ufc/mL, viabilitatea culturii *L. casei* 431® a scăzut cu 2 log ufc/mL după 14 de zile de depozitare, și respectiv cu 1 log ufc/mL, după încă 7 zile de depozitare. În combinația LC+LA+BB+FD, viabilitatea *L. casei* 431® a scăzut după 14 zile de la 4,1 10⁹ ufc/mL la 5,8 10⁸ ufc/mL. După 21 de zile de depozitare, a fost înregistrată o tendință redusă de creștere comparativ cu 14 zile, respectiv de la 5,8 10⁸ ufc/mL la 7,3 10⁸ ufc/mL.

Evoluția viabilității culturii BB-12® în cultură mixtă BB+LC+LA+FD, a înregistrat după 14 de zile și respectiv 21 zile de conservare în condiții de refrigerare, o reducere a numărului de celule viabile la puțin peste nivelul de 10⁶ ufc/mL (figura 5.12.). În toate celelalte combinații: BB+LA+FD; BB+LA+FD; BB+FD, tulpina BB-12® a prezentat o scădere drastică a viabilității după 14 zile de păstrare, de la 10⁸ ufc/mL la mai puțin de 10⁶ ufc/mL, valoarea de 10⁶ ufc/mL fiind nivelul minim de viabilitate recomandat pentru tulpinile probiotice în alimentele probiotice.

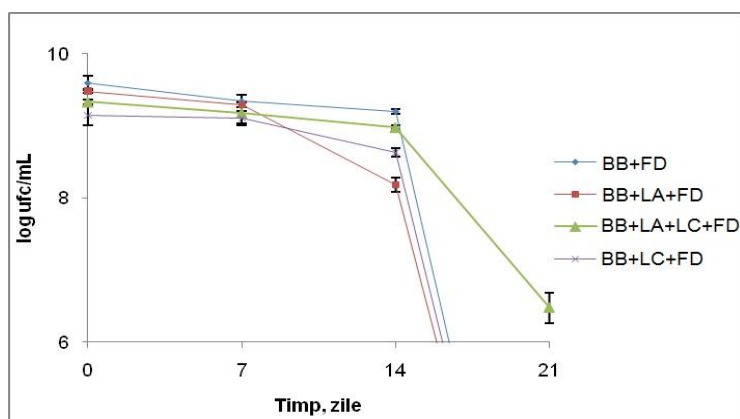


Figura 5.12. Viabilitatea în produsele fermentate aculturii probiotice BB-12® (Bb), pe perioada conservării în condiții de refrigerare, timp de 21 de zile (FD - Flora Danica, LA - LA-5®, LC - *L. casei* 431®, BB - BB-12®)

În literatura de specialitate, există doar câteva studii care descriu comportamentul tulpinilor probiotice în combinație cu bacterii lactice mezofile. Rezultatele studiului de față confirmă faptul că tulpinile de bacterii probiotice LA-5®, *L. casei* 431® și BB-12® pot fi utilizate la fabricarea produselor lactate, altele decât iaurturi, ca de exemplu în lapte acru, sana sau chefir, în combinații cu culturi mezofile, acestea menținându-și proprietățile probiotice pe toată durata termenului de valabilitate.

5.4. Concluzii parțiale

- Culturile probiotice LA-5®, *L. casei* 431® și BB-12® au fost testate din punct de vedere al comportamentului biotehnologic și a viabilității în mai multe combinații de culturi starter LA+LC+BB+FD; LA+BB+FD; LC+BB+FD; LA+LC+FD; LA+FD; LC+FD; BB+FD, în vederea

obținerii de produse lactate tip Sana probiotice. Culturile testate au prezentat un comportament diferit în timpul procesului fermentativ și pe perioada conservării.

- Multiplicarea tulpinilor probiotice testate în culturi multiple cu cultura mezofilă Flora Danica variază în funcție de tulpină și de combinațiile utilizate, cea mai bună combinație în care s-a înregistrat un comportament adecvat al tulpinilor probiotice fiind LA+LC+FD.
- În ceea ce privește viabilitatea tulpinilor probiotice în timpul celor 21 de zile de păstrare la temperatura de 4°C, cel mai mare grad de supraviețuire, respectiv de 8 log ufc/mL și de 9 log ufc/mL au prezentat culturile *L. casei* 431® în combinația LC+BB+FD și LA-5® în combinația LA+LC+FD.
- Combinațiile de tulpini probiotice LA-5® și *L. casei* 431® cu cultura mezofilă Flora Danica au fost identificate drept combinații optime recomandate în cercetări ulterioare în vederea obținerii de produse lactate funcționale de tip Sana.

6. Optimizarea condițiilor biotehnologice de obținere a produselor lactate probiotice de tip Sana utilizând culturi starter multiple

Unul dintre obiectivele acestei cercetări a fost de a identifica factorii esențiali care influențează comportamentul biotehnologic și viabilitatea culturilor probiotice LA-5® și *L. casei*-431® în culturi multiple cu Flora Danica, în condițiile tehnologice specifice de obținere a produselor lactate fermentate de tip Sana.

Un al doilea obiectiv al studiilor realizate în această etapă a fost optimizarea condițiilor biotehnologice de obținere a produsului probiotic Sana, utilizând culturi probiotice și folosind făina de hrișcă cu rol prebiotic. Optimizarea s-a realizat folosind metode de analiză statistică și modelare matematică.

6.2. Materiale și metode de investigare și analiză statistică

6.2.1. Materiale

Culturi de bacterii lactice

- *Lactobacillus acidophilus* LA-5® (10¹¹ ufc/g) și *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* *L. casei*-431® (0,5·10¹¹ ufc/g), culturi de bacterii probiotice de la Chr. Hansen Danemarca, în formă liofilizată.
- Flora Danica, cultură mezofilă aromatizantă ce conține speciile: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* și *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* de la Chr. Hansen Danemarca, în formă liofilizată.

Prebiotice

Ca ingrediente prebiotice s-au utilizat făina de hrișcă și inulina.

Făina de hrișcă a fost obținută din boabe de hrișcă provenite din Republica Moldova, sterilizate în prealabil cu radiații ultraviolete la lungimea de undă $\lambda = 254 \text{ nm}$, timp de 30 minute, prin măcinare în condiții aseptice (Bosch, Germany), timp de 15 minute. Compoziția chimică a făinii de hrișcă este prezentată în tabelul 6.1.

Tabelul 6.1. Compoziția chimică a făinii de hrișcă (%)

Componente	%
Apă	12,8
Proteine	7,9
Grăsimi	1,5
Substanțe extractive neazotate	76,1
Celuloză	0,6

Inulina, produs comercial, a fost obținută din cicoare și a fost achiziționată de la compania Enzime & Derivate, Neamț, Romania. Înainte de utilizare inulina a fost sterilizată în prealabil cu radiații ultraviolete, timp de 30 de minute.

Medii fermentative

- MRS agar (Merk)

Reactivi

- Anaerocult® A (Merck); antibiotice: clindamicină (Sigma), ciprofloxacina (Bayer)

Aparatura

- balanța analitică (XS 403 SM, Metter Toledo); vase sterile Erlenmeyer; pH-metru portabil (Portamess ®911, Switzerland)

6.2.2. Metode de investigare și de prelucrare statistică a datelor experimentale

Pregătirea inoculului și inocularea probelor

Pentru prepararea inoculului și a produselor fermentate s-a utilizat lapte UHT produs la Prodlacta Brașov cu următoarea compoziție (g/100 mL lapte): grăsimi 3,5 g; carbohidrați 4,5 g; proteine 2,9 g; grăsimi saturate 0 g, grăsimi polinesaturate 0 g, colesterol 0 mg, sodiu 0 mg, fibre 0 g, zaharuri 0 g.

Pentru a fi omogen, inoculul a fost pregătit separat pentru fiecare cultură starter. Culturile au fost dozate în condiții aseptice folosind balanța analitică (XS 403 SM, Metter Toledo), în vase sterile Erlenmeyer, peste care s-a adăugat un volum cunoscut de lapte. După omogenizare, inoculul fiecărei culturi a fost termostatat timp de 15 minute, la temperatura de 37°C pentru reactivare.

Pregătirea probelor a constat în repartizarea de cantități diferite de inocul și de prebiotice în vase sterile Erlenmeyer și apoi adăugarea de lapte până la 100 mL.

Inoculul de producție s-a obținut prin combinarea în diferite proporții a culturii mezofile Flora Danica cu culturile de bacterii probiotice LA-5® și *L. casei*-431®. Combinațiile utilizate au fost în

cultură dublă (Flora Danica cu LA-5® și Flora Danica cu *L. casei*-431®) sau în cultură multiplă (Flora Danica cu LA-5® și *L. casei*-431®).

Probele obținute au fost termostatate la temperaturi diferite până când pH-ul a atins valoarea 4,6, acesta fiind monitorizat din oră în oră cu ajutorul pH-metrului portabil (Portamess ®911, Switzerland). După fermentare, probele au fost conservate la temperatura de 4°C, timp de 7 zile.

Viabilitatea celulelor din produsele fermentate a fost determinată la sfârșitul fermentării și după 7 zile de păstrare la temperatura de 4°C.

Numărarea selectivă a bacteriilor probiotice

Numărarea celulelor aparținând culturilor probiotice LA-5® și *L. casei*-431® s-a realizat prin metoda de numărare indirectă, prin cultivare în condiții selective pe mediul MRS agar (Merk) (în conformitate cu prevederile standardului ISO 8261 IDF122:2001).

Pentru numărare au fost alese plăcile Petri cu număr de colonii între 15 și 300. Rezultatele au fost raportate ca unități formatoare de colonii pe mililitru (ufc/mL) produs fermentat. Datele obținute în urma cercetărilor reprezintă media a trei experimente diferite realizate în duplicat.

Metode de analiză statistică și modelare matematică

În vederea selecției factorilor semnificativi cu influență asupra comportamentului biotehnic și asupra viabilității bacteriilor probiotice în culturi mixte, s-a utilizat tehnica Plackett-Burman și metoda analizei suprafeței de răspuns, utilizând programul de calcul Design-Expert 8® (Versiunea 8.0.2.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA).

Datele obținute în urma aplicării metodei analizei suprafeței de răspuns au fost analizate prin analiza ANOVA (Analysis of Variance).

6.3. Rezultate și discuții

6.3.1. Identificarea unor factori cu influență semnificativă asupra funcționalității și a viabilității bacteriilor probiotice în culturi starter multiple

În tehnologia produselor lactate funcționale fermentate, îmbunătățirea funcționalității metabolice și a viabilității bacteriilor probiotice se poate realiza, în general, prin controlul și dirijarea principalilor parametri biotehnologici (factori fizico-chimici și biologici).

Realizarea optimizării prin tehnica Plackett—Burman s-a realizat în două etape experimental - statistice.

În prima etapă s-a studiat efectul a șapte factori considerați că pot influența comportamentul biotehnic și viabilitatea bacteriilor starter în timpul fermentării și a conservării produselor finite, într-o serie de 8 experimente, din care s-au selecționat trei factori cu cea mai pregnantă influență pozitivă.

În a doua etapă s-a studiat efectul cantitativ corelat al celor trei factori (variabile independente), într-o serie de douăzeci de experimente.

Selecția variabilelor independente și a tipului de influențe asupra comportamentului culturilor starter

Pentru selecția variabilelor independente ce influențează comportamentul biotehologic și viabilitatea bacteriilor probiotice în produsele lactate fermentate s-au analizat factorii care intervin în procesul de fabricație cu efecte directe asupra multiplicării, viabilității și stabilității culturilor de bacterii starter și anume:

- dimensiunea inoculului;
- raportul dintre speciile implicate;
- temperatura de fermentare;
- pH-ul de stopare a procesului de fermentare;
- concentrația de prebiotic, inulină și făină de hrișcă.

Limitele de variație ale parametrilor analizați au fost stabilite prin consultarea literaturii de specialitate, astfel încât media dintre limita superioară și cea inferioară de variație să fie cât mai apropiată de condițiile optime (tabelul 6.2).

Alegerea limitelor de variație ale parametrului temperatură de fermentare între 30°C și 37°C este explicată prin faptul că în procesul de fermentare au fost utilizate culturi mezofile combinate cu tulpini probiotice, iar eventualele interacțiuni dintre aceste culturi au loc în acest domeniu de temperatură, optimul lor de activitate situându-se în acest interval.

Variația raportului dintre culturile probiotice LA-5® și *L. casei*-431® și cultura mezofilă Flora Danica a fost stabilită între valorile de 0,5 și 1,5, raportul optim fiind considerat în literatura de specialitate de 1:1. Cultura mezofilă Flora Danica inițiază fermentația, produce compuși de aromă și exopolizaharide, contribuind la definirea caracteristicilor senzoriale ale produselor fermentate. Literatura de specialitate menționează faptul că prin activitatea proteolitică, speciile de bacterii din această cultură eliberează aminoacizi prin hidroliza laptelui, care vor constitui surse nutritive și de factori de creștere pentru culturile de bacterii probiotice.

Domeniul de variație a raportului dintre cele două culturi probiotice LA-5® și *L. casei*-431® s-a stabilit între 0,5 și 1,5, parametrul fiind introdus în studiu pentru a evidenția efectul sinergic sau de competiție între specii, în practică recomandându-se utilizarea unui raport de 1:1.

pH-ul optim de oprire a procesului fermentativ a fost ales la valoarea 4,6 deoarece în timpul răcirii pH-ul mai scade până la valoarea de 4,5 care reprezintă punctul izoelectric al cazeinei. La aceasta valoare se consideră că toată lactoza din lapte a fost metabolizată și fermentarea este finalizată, iar coagulul format are stabilitate maximă.

Concentrația prebioticelor, inulină și hrișcă, a fost stabilită ținând cont de recomandările de dozaj ale furnizorilor astfel încât acestea să influențeze pozitiv multiplicarea și viabilitatea tulpinilor de probiotice.

Tabelul 6.2. Stabilirea limitelor de variație ale parametrilor selectați pentru proiectarea experimentelor prin tehnica Plackett-Burman

Nr. crt.	Parametri (Variabile independente)	Unitatea de măsură	Simbol	Limitele variabilelor		
				minimă	medie	maximă
1	Dimensiune inocul	log ufc/mL	X ₁	8,0	9,0	10,0
2	Raport cultură probiotică: cultura Flora Danica	-	X ₂	0,5	1,0	1,5
3	Raport culturi probiotice LA-5® : <i>L. casei</i> -431®	-	X ₃	0,5	1,0	1,5
4	Temperatura de fermentare	°C	X ₄	30,0	33,5	37,0
5	pH-ul de stopare a procesului fermentativ	unități de pH	X ₅	4,2	4,6	5,0
6	Concentrația de inulină	% (m/v)	X ₆	3,0	4,0	5,0
7	Concentrația de făină de hrișcă	% (m/v)	X ₇	3,0	5,0	7,0

Cu cei șapte parametri aleși, prin modelul ortogonal statistic experimental Plackett-Burman pentru șapte variabile, utilizând softul Design-Expert 8® (k=7, N=7+1; k-număr de variabile, N-număr de experimente), s-a generat o matrice pentru 8 experimente.

Răspunsurile analizei statistice au vizat evaluarea gradului de multiplicare al bacteriilor probiotice cultivate în culturi multiple în timpul procesului fermentativ și a viabilității acestora în timpul conservării prin refrigerare după 7 zile de păstrare la temperatura de 4°C (tabelul 6.5).

Tabelul 6.5. Gradul de multiplicare și menținerea viabilității bacteriilor probiotice, în produse lactate fermentate tip Sana cu culturi starter multiple

Număr experiment	Număr probiotice, log ufc/mL			
	La-5®		L. casei-431®	
	După fermentare	După păstrare timp de 7 zile la temperatura de 4°C	După fermentare	După păstrare timp de 7 zile la temperatura de 4°C
1	10,16	9,33	10,33	9,96
2	9,15	9,06	8,95	9,19
3	8,91	7,65	8,86	8,94
4	8,69	7,74	8,77	8,53
5	9,74	9,10	9,84	9,86
6	9,01	8,38	8,97	8,96
7	9,81	9,02	9,74	9,57
8	10,38	9,19	10,33	10,14

Diagramele Pareto în care sunt observați factorii cu efect pozitiv, respectiv, gradul lor de influență asupra viabilității celor două tulpini probiotice LA-5® și *L. casei*-431®, după fermentare și după păstrare timp de 7 zile la temperatura de 4°C, sunt prezentate în figurile 6.1÷ 6.4.

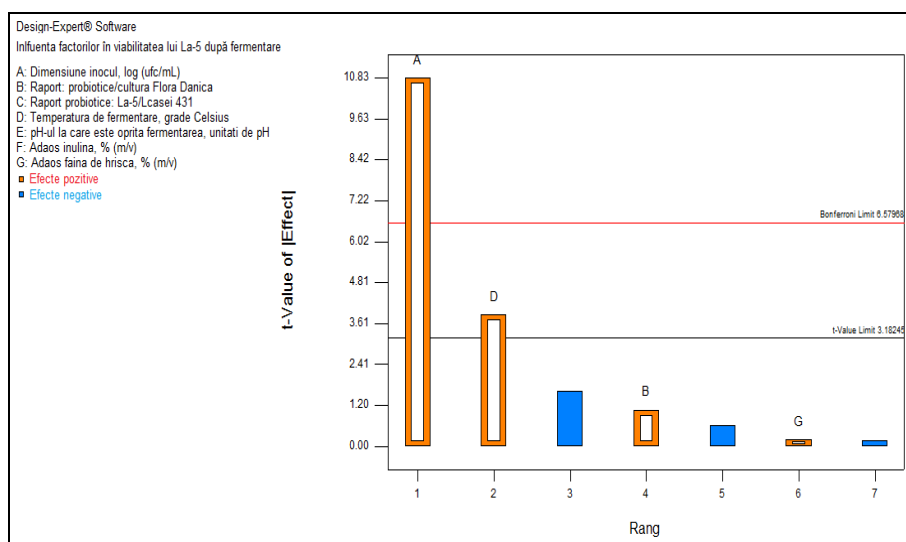


Figura 6.1. Influența variabilelor indendente asupra multiplicării culturii probiotice LA-5®, în culturi multiple, în condiții favorabile bacteriilor mezofile

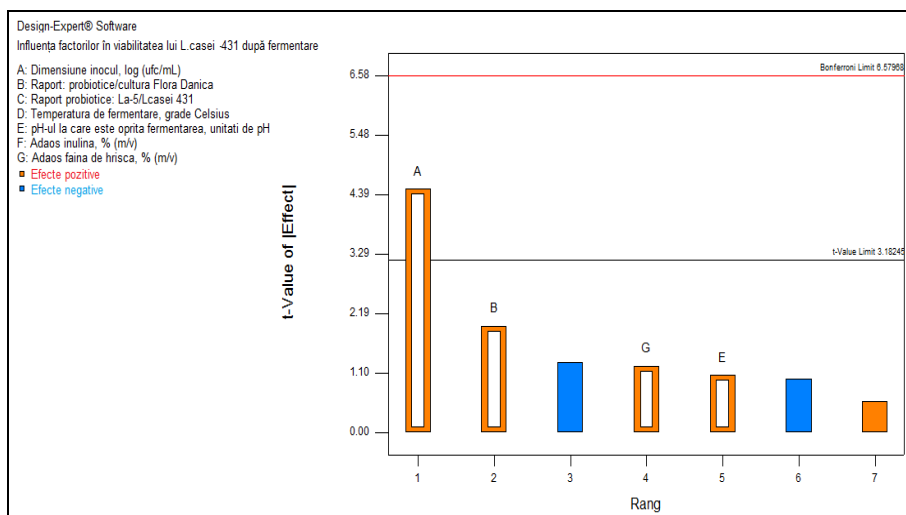


Figura 6.2. Influența variabilelor indendente asupra multiplicării culturii probiotice *L. casei* - 431®, în culturi multiple, în condiții favorabile bacteriilor mezofile

Se observă că o influență pozitivă asupra gradului de multiplicare *in vitro* a culturilor probiotice în culturi multiple o au factorii: dimensiunea inoculului, raportul probiotice:cultură mezofilă Flora Danica și concentrația de făină de hrîșcă.

Din diagramele prezentate în figurile 6.3 și 6.4, se poate concluziona că cei mai semnificativi factori care exercită influență pozitivă asupra menținerii viabilității culturilor probiotice, după 7

zile de păstrare, la temperatura de 4°C sunt: dimensiunea inoculului, temperatura de fermentare și concentrația de făină de hrișcă, pentru cultura LA-5® o influență pozitivă având și raportul între cele două probiotice. Analizând viabilitatea celor două tulpini probiotice pe perioada de păstrare a produselor fermentate timp de 7 zile la temperatura de 4°C, se observă că în cazul culturii LA-5® numărul de celule viabile s-a redus, având în vedere că tulpinile probiotice prezintă o anumită sensibilitate la mediul acid din produs. În cazul culturii *L. casei*-431® numărul de celule s-a păstrat relativ constant sau chiar a crescut ușor, fenomen care se poate explica prin faptul că tulpina este mezofilă și, pe parcursul răcirii, având disponibili încă nutrienții generați în timpul fermentației, să-și fi continuat reacțiile metabolice. Acest rezultat confirmă faptul că dozajul inițial al culturii starter, respectiv concentrația de celule din inocul, trebuie să fie suficient de mare pentru a asigura o concentrație adecvată de celule probiotice viabile pe toată perioada termenului de valabilitate al produsului, în acord cu prevederile tehnice privind calitatea produselor probiotice.

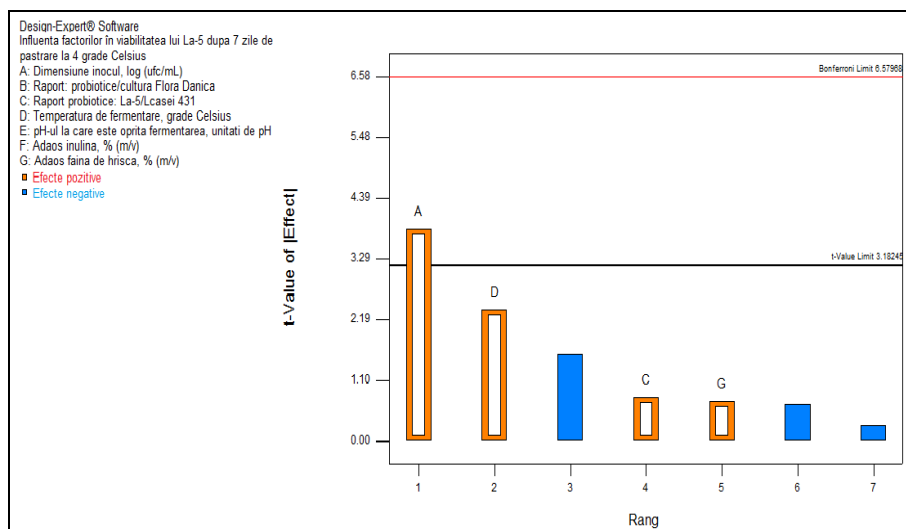


Figura 6.3. Influența variabilelor independente asupra viabilității, după 7 zile de păstrare la temperatura de 4°C, culturii probiotice LA-5®, în produse lactate fermentate cu culturi multiple, în condiții favorabile bacteriilor mezofile

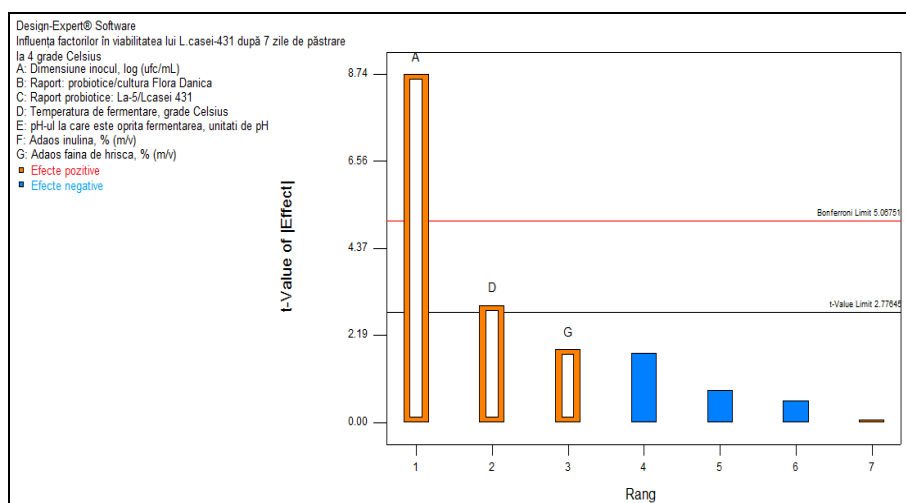


Figura 6.4. Influența variabilelor independente asupra viabilității, după 7 zile de păstrare la temperatura de 4°C, culturii probiotice *L. casei*-431®, în produse lactate fermentate cu culturi multiple, în condiții favorabile bacteriilor mezofile

Pentru a evalua gradul de influență al factorilor analizați asupra procentului de supraviețuire a culturilor probiotice în condițiile fermentative testate s-a calculat procentul de celule viabile după 7 zile de păstrare la temperatura de 4°C în raport cu concentrația de celule vii la sfârșitul fermentării.

Din analiza diagramelor Pareto (figurile 6.5. și 6.6) se observă că factorii cu cea mai mare influență sunt: dimensiunea inoculului, pH-ul la care a fost oprită fermentarea și concentrația de prebiotic (inulină și făină de hrișcă).

Relevanța acestor factori poate fi explicată sub mai multe aspecte. Astfel, concentrația de făină de hrișcă influențează pozitiv metabolismul culturilor probiotice prin furnizare de compuși biologic activi ușor de metabolizat, cu rol de factori de creștere. Pentru cultura *L.casei-431*®, un factor cu efect pozitiv ce a influențat viabilitatea este și raportul dintre cele două culturi probiotice. Acest raport este invers proporțional cu concentrația de celule de *L. casei-431*®, o concentrație mai mare de celule în inocul ale acestui probiotic putând conduce la dominanța acestei bacterii lactice asupra microbiotei produsului finit. Influența pozitivă a pH-ului la care este oprită fermentarea asupra menținerii viabilității culturii *L.casei-431*® poate fi explicată prin faptul că această cultură tolerează mediul acid, aspect confirmat și de rezultatele exemplificate în tabelul 6.5.

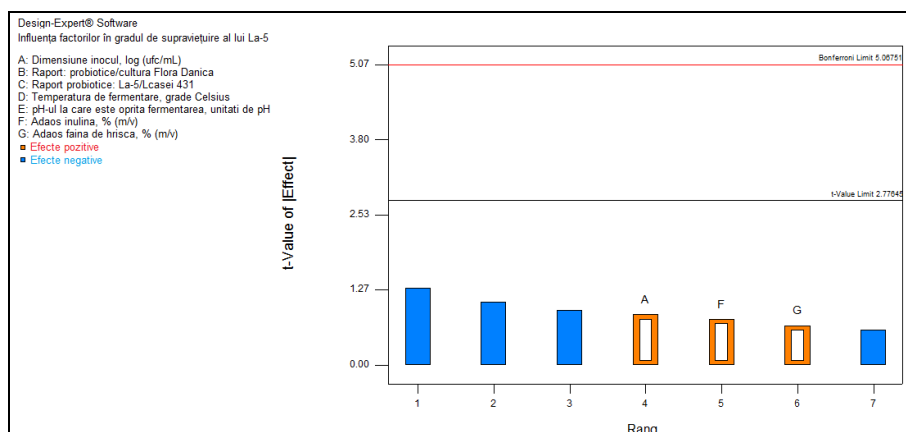


Figura 6.5. Influența variabilelor independente asupra stabilității la păstrare timp de 7 zile în condiții de refrigerare, a celulelor aparținând culturii LA-5®, în produse fermentate tip Sana cu culturi multiple

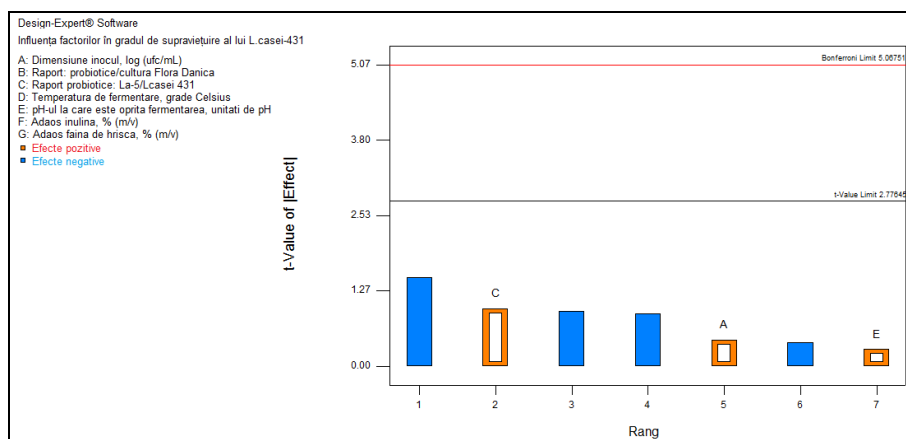


Figura 6.6. Influența variabilelor independente asupra stabilității la păstrare timp de 7 zile în condiții de refrigerare, a celulelor aparținând culturii *L. casei-431*®, în produse fermentate tip Sana cu culturi multiple

Studiile au demonstrat că factorii care exercită o influență pregnantă asupra multiplicării bacteriilor probiotice, în culturi multiple, în condiții de fermentare favorabile bacteriilor mezofile și totodată asupra menținerii viabilității în produsele fermentate în timpul conservării sunt: dimensiunea inoculului, temperatura de fermentare, raportul culturii probiotice:cultura Flora Danica și concentrația de făină de hrișcă.

Acești factori semnificativi au fost în continuare studiați pentru a evalua efectul lor corelativ asupra funcționalității și stabilității culturilor probiotice în culturi multiple cu bacterii mezofile.

6.3.2. Optimizarea funcționalității și a stabilității bacteriilor probiotice LA-5® și *L. casei*-431® în culturi multiple, utilizând metoda analizei suprafeței de răspuns

Metoda suprafeței de răspuns a fost utilizată pentru optimizarea factorilor importanți ce influențează înmulțirea și menținerea unei viabilități ridicate a culturilor probiotice LA-5® și *L. casei* 431® în culturi multiple cu cultura mezofilă Flora Danica în produse fermentate tip Sana în medii cu făină de hrișcă, cu rol prebiotic.

Factorii semnificativi stabiliți anterior, care s-au ales pentru a fi optimizați au fost: temperatura de fermentare, raportul de probiotice:cultura mezofilă Flora Danica și concentrația de făină de hrișcă. Dimensiunea inoculului a fost de 10⁹ ufc/mL, iar valoarea pH-ului la care s-a oprit fermentarea a fost 4,6.

Obiectivul prezentului studiu a fost alegerea combinației optime a acestor factori pentru o valoare maximă a înmulțirii și a menținerii viabilității bacteriilor probiotice în culturi multiple, după fermentare și după 7 zile de păstrare la temperatura de 4°C. Factorii semnificativi și nivelurile de variație sunt prezentate în tabelul 6.6.

Tabelul 6.6. Factorii semnificativi și nivelurile de variație

Variabile independente	Unitate de măsură	Cod	Niveluri de variație ale variabilelor independente				
			-1,682	-1	0	+1	+1,682
Temperatura de fermentare	°C	A	28,6	32	37	42	45,4
Raport culturii probiotice:cultura mezofilă Flora Danica	-	B	0,66	1	1,5	2	2,34
Concentrația de făină de hrișcă	% (m/v)	C	1,64	3	5	7	8,37

Un tip de optimizare oferit de programul Design Expert 8® este realizat prin reprezentarea grafică sub formă de cub cu puncte axiale, factoriale și punct central de optimizare.

În figurile 6.25 și 6.26 sunt prezentate condițiile optime ce descriu efectul corelat al celor trei variabile independente (temperatura de fermentare, raportul cultură probiotică:cultură mezofilă și adaosul de făină de hrișcă cu rol prebiotic) asupra viabilității bacteriilor probiotice LA-5® și *L.casei*-431® în produse lactate fermentate cu culturi multiple mezofile.

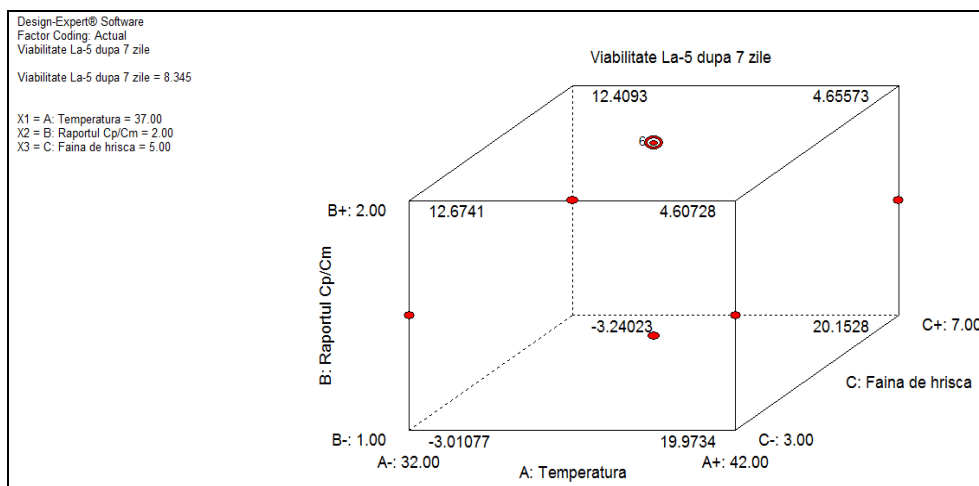


Figura 6.25. Condițiile biotehnologice optime pentru obținerea produselor lactate fermentate cu culturi multiple, în condiții favorabile bacteriilor mezofile, care să asigure un procent standardizat de celule viabile ale culturii LA-5® în produsul finit, pe perioada conservării

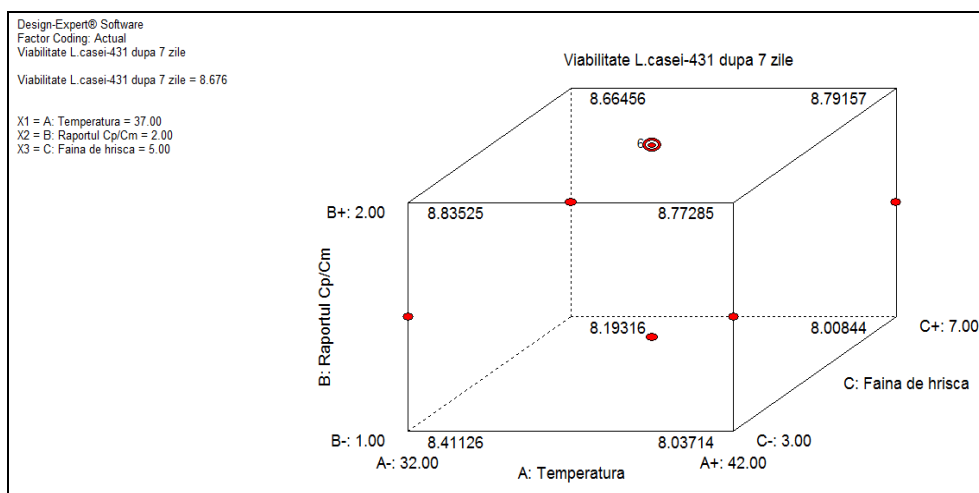


Figura 6.26. Condițiile biotehnologice optime pentru obținerea produselor lactate fermentate cu culturi multiple, în condiții favorabile bacteriilor mezofile, care să asigure un procent standardizat de celule viabile ale culturii *L. casei-431*®, în produsul finit, pe perioada conservării

Astfel, condițiile biotehnologice optime pentru a asigura un procent adecvat de viabilitate culturii probiotice LA-5® (8.34 log ufc/mL) sunt: temperatura de 37°C, un adaos de 5% (m/v) făină de hrișcă și un raport cultură probiotică: cultură mezofilă Flora Danica de 2:1.

În cazul culturii, *L. casei-431*® o concentrație de celule viabile de 8,67 log ufc/mL se obține în aceleași condiții biotehnologice stabilite anterior, ceea ce oferă un avantaj major în cazul utilizării celor două culturi probiotice în culturi multiple.

6.3.3. Validarea condițiilor biotehnologice optime de obținere a produsului lactat probiotic utilizând culturi starter multiple cu bacterii mezofile

Pentru validarea condițiilor biotehnologice optime pentru a asigura un procent adecvat de viabilitate pentru culturile probiotice LA-5® și *L. casei*-431® în produsul lactat probiotic, fermentat cu culturi starter multiple cu bacterii mezofile și depozitat la temperatura de 4°C, s-au realizat experimente respectând condițiile biotehnologice optime rezultate prin modelare matematică și analiză statistică, respectiv temperatura de fermentare de 37°C, un adaos de 5% (m/v) făină de hrișcă și un raport cultură probiotică: cultură mezofilă Flora Danica de 2:1.

Pentru a confirma concentrația optimă de făină de hrișcă de 5% (m/v) necesară a fi adăugată pentru a asigura un procent adecvat de viabilitate culturilor probiotice LA-5® și *L. casei*-431® în timpul fermentării și depozitării la temperatura de 4°C timp, timp de 21 de zile, s-au testat și efectele adaosului de făină de hrișcă de 3% și, respectiv, 7% (m/v) asupra viabilității culturilor probiotice.

În figurile 6.27 și, respectiv 6.28, se prezintă dinamica menținerii viabilității culturilor probiotice LA-5® și *L. casei*-431® în produsul lactat probiotic fermentat, pe o perioadă de 21 de zile de depozitare la temperatura de 4°C, în medii cu diferite concentrații de prebiotic.

În figura 6.27 se observă faptul ca viabilitatea culturii probiotice LA-5® în produsul lactat probiotic după 21 de zile de depozitare la temperatura de 4°C, este maximă când laptele este suplimentat cu 5% (m/v) făină de hrișcă. Viabilitatea culturii probiotice LA-5® se păstrează timp de 14 zile de depozitare la temperatura de 4°C, procentul de celule viabile scăzând după 21 de zile de păstrare, comparativ cu inocul doar cu 0,5 log ufc/mL. În mediile în care laptele s-a suplimentat cu 3% și, respectiv, 7% (m/v) făină de hrișcă, viabilitatea culturii probiotice LA 5® a prezentat o scădere de aproximativ 1 și, respectiv, 1,5 log ufc/mL, comparativ cu concentrația de celule din inocul.

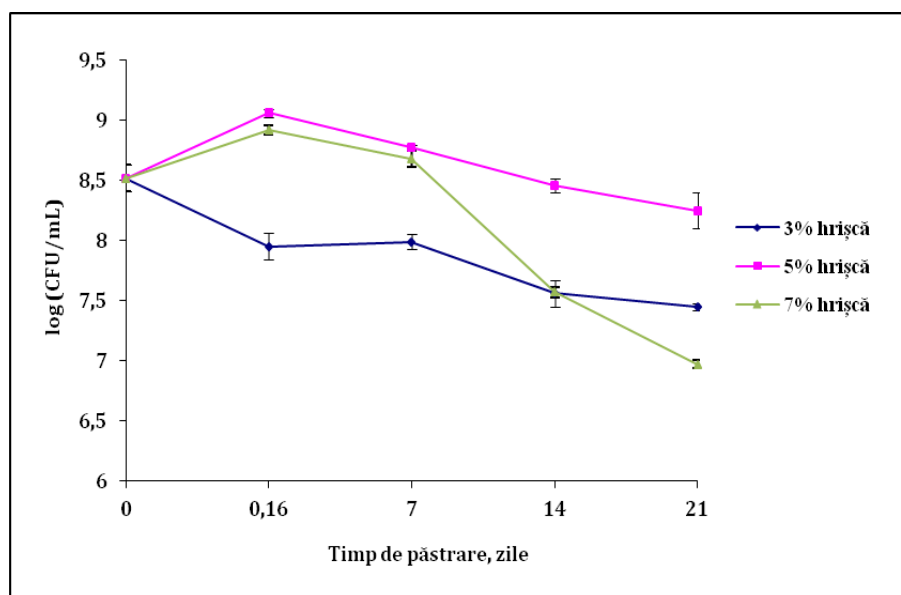


Figura 6.27. Dinamica viabilității celulelor culturii probiotice LA-5®, în produsul lactat fermentat, cu adaosuri diferite de făină de hrișcă, pe perioada fermentării și a depozitării la temperatura de 4°C, timp de 21 de zile.

În figura 6.28 se observă că viabilitatea culturii probiotice *L.casei-431*[®] după 21 de zile de depozitare la temperatura de 4°C are valoarea cea mai ridicată în produsul lactat fermentat cu un adaos de 5% (m/v) făină de hrișcă. În acest produs, viabilitatea celulelor de *L. casei-431*[®] a crescut de la 8,5 log ufc/mL la 9 log ufc/mL, după 7 zile de depozitare, după care s-a menținut constantă până la 14 zile, iar după 21 de zile a scăzut de la 9 log ufc/mL la 8,5 log ufc/mL.

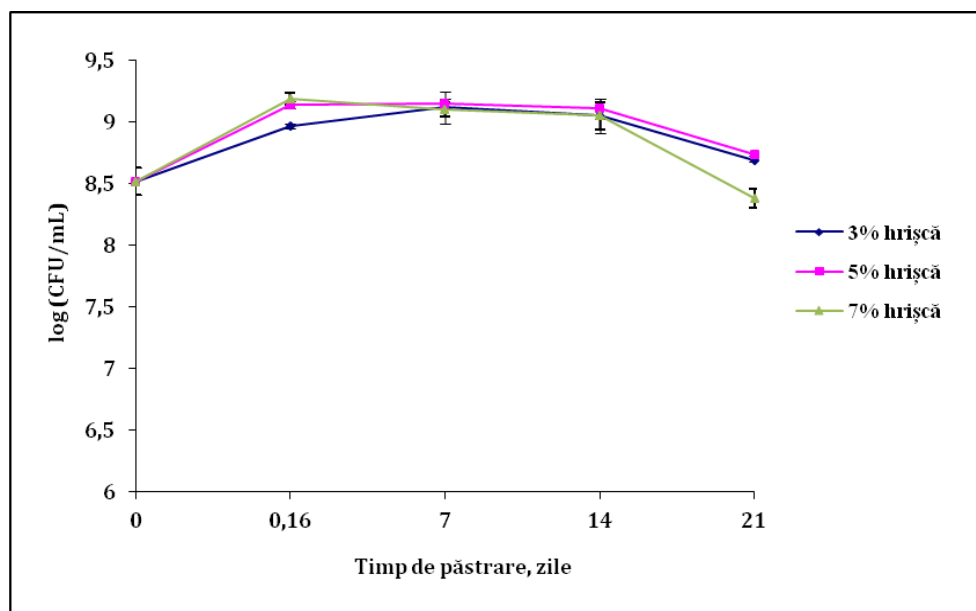


Figura 6.28. Dinamica viabilității celulelor culturii probiotice *L. casei-431*[®], în produsul lactat fermentat, cu adaosuri diferite de făină de hrișcă, pe perioada fermentării și a depozitării la temperatura de 4°C, timp de 21 de zile.

Viabilitatea culturilor probiotice în produsul lactat fermentat obținut în condiții experimentale, în acord cu influența corelată a parametrilor analizați (variabile independente): temperatura de fermentare de 37°C, raportul cultură probiotică:cultură mezofilă de 2:1 și adaosul de făină de hrișcă 5% (m/v), după 7 zile de depozitare la temperatura de 4°C sunt de 9,06 log ufc/mL pentru LA-5[®], respectiv de 9,16 log ufc/mL pentru *L. casei-431*[®], valori superioare celor predicționate de modelul matematic obținut (8,34 log ufc/mL pentru LA-5[®], respectiv 8,67 log ufc/mL pentru *L. casei-431*[®]) ceea ce denotă faptul ca modelul este valid și are aplicabilitate în practică, în condițiile reale de procesare biotehnologică.

6.4. Concluzii parțiale

- Cunoscându-se importanța menținerii viabilității bacteriilor probiotice din produsele lactate acide în timpul păstrării, pentru a permite funcționalitatea acestora *in vivo*, prin tehnici de modelare matematică și analiză statistică folosind metodele Plackett-Burman și metoda analizei suprafeței de răspuns, s-a studiat efectul corelat al unor factori biotehnologici asupra înmulțirii și stabilității bacteriilor probiotice LA-5[®] și *L. casei-431*[®] în produse lactate fermentate tip Sana, utilizând culturi multiple.
- Studiile au demonstrat că principalii factori care influențează viabilitatea celulelor culturilor probiotice în produsele lactate fermentate tip Sana, utilizând culturi multiple,

sunt: temperatura de fermentare, raportul cultură probiotică:cultură mezofilă (Flora Danica) și concentrația de făină de hrișcă, cu rol prebiotic.

- Pentru produsele în care se utilizează culturile probiotice LA-5® și *L. casei*-431®, pentru a asigura concentrația standard de celule probiotice viabile în produsul finit pe toată perioada termenului de valabilitate se recomandă respectarea următoarelor condiții biotehnologice: temperatura de fermentare 37°C, un adaos de 5% (m/v) făină de hrișcă și un raport de culturi probiotice:cultură mezofilă Flora Danica de 2,0.
- Modelele matematice identificate descriu fidelitatea proceselor practice, rezultatele fiind confirmate prin validare.

7. Experimente la nivel industrial de obținere de noi produse lactate fermentate cu tulpini de bacterii probiotice, în condiții favorabile bacteriilor mezofile

7.1. Obținerea la nivel industrial și caracterizarea microbiologică a produselor lactate fermentate noi formulate

Obiectivul studiilor prezentate în acest capitol au vizat obținerea la nivel industrial de noi produse lactate fermentate de tip Sana, utilizând culturi probiotice multiple și prebiotic făină de hrișcă. În stabilirea condițiilor tehnologice s-au avut în vedere rezultatele obținute în studiile de optimizare, astfel încât să se asigure menținerea viabilității culturilor probiotice LA-5® și *L. casei*-431® în produsele lactate fermentate noi formulate pe durata termenului de valabilitate.

Experimentul industrial a fost realizat la compania SC Almera International SRL, Bacău, companie ce se află în topul producătorilor din România de produse lactate fermentate de tip Sana.

7.1.2. Materiale și metode de analiză

Lapte materie primă

Lapte din colectare, pasteurizat, normalizat și omogenizat pe linia industrială Alfa-Laval, cu următoarele caracteristici fizico-chimice: aciditate: 15° T; grăsime: 3,55%; densitate: 1028,5; proteine: 3,02%; substanță uscată 7,8%; test de antibiotice: negativ.

Culturi starter

- Culturile starter comerciale probiotice LA-5® și *L. casei* 431® comercializate Chr. Hansen, Danemarca sub formă liofilizată. .
- Cultura Flora Danica conținând bacterii lactice mezofile, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* și *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, comercializată de asemenea de Chr. Hansen, Danemarca, sub formă liofilizată.

Făina de hrișcă

Făina de hrișcă de la Solaris S.R.L., România. Înainte de utilizare făina de hrișcă a fost menținută timp de o oră și jumătate la tratament cu ultraviolete pentru sterilizare.

Pregătirea probelor

Culturile starter liofilizate au fost utilizate ca atare, fără reactivare, conform recomandărilor producătorului. Numărul inițial de celule inoculate a fost de 9 log ufc/mL pentru toate tipurile de culturi, combinate în raport de 1:2.

Produsele fermentate au fost obținute cu combinații ale culturii mezofile Flora Danica cu culturile probiotice LA-5® și *L. casei* 431® în cultură dublă FD + LA și FD + LC sau în cultură multiplă FD + LA + LC.

Codificarea probelor a fost următoarea:

- **Proba 1:** FD – produs fermentat cu cultura mezofilă Flora Danica, cu adaos de 5% făină de hrișcă (g/v);
- **Proba 2:** FD + LA – produs fermentat cu combinația de culturi Flora Danica și LA 5®, cu adaos de 5% făină de hrișcă (g/v);
- **Proba 3:** FD + LC – produs fermentat cu combinația de culturi Flora Danica și *L. casei* 431®, cu adaos de 5% făină de hrișcă (g/v);
- **Proba 4:** FD + LA + LC - produs fermentat cu combinația de culturi Flora Danica, LA 5® și *L. casei* 431®, cu adaos de 5% făină de hrișcă (g/v).

După inoculare, probele au fost termostate la temperatura de 37°C până când pH-ul a atins valoarea 4,6. După fermentare probele au fost depozitate la temperatura de 4°C, timp de 21 de zile, această durată reprezentând termenul de valabilitate standard al produselor lactate de tip Sana. Viabilitatea celulară a fost analizată la sfârșitul procesului fermentativ și la intervale de 7, 14 și respectiv 21 zile, în timpul conservării.

Descrierea experimentului industrial

Pentru fiecare probă în parte s-au fabricat șarje de câte 20 l lapte (în bidoane de inox), în care a fost adăugată făina de hrișcă în proporție de 5%, și care au fost apoi inoculate cu culturi conform dozajelor stabilite în etapa de optimizare.

Făina de hrișcă și culturile au fost omogenizate în produs prin amestecare timp de 10 minute pentru o distribuție uniformă, iar produsele astfel pregătite s-au ambalat pe linia industrială în pahare de plastic de 175 g, care s-au sigilat cu platine de aluminiu. S-au etichetat diferențiat și s-au introdus în termostatul industrial reglat la temperatura de 37°C. Aici s-au măsurat continuu temperatura în produs și pH-ul, prin folosirea unui pH-metru Knick cu electrozi de pH și temperatură. Probele au fost ținute în termostat până la atingerea valorii de pH de 4,6, când a fost considerată finalizată fermentarea. Apoi, produsele finite au fost menținute în depozitul frigorific la temperatura de 4°C.

Premisele experimentului industrial

Condițiile de testare industrială au rezultat din etapa de optimizare de laborator când s-au selectat cei trei factori semnificativi în optimizarea utilizării culturilor probiotice în culturi

multiple în prezența culturii mezofile Flora Danica, în produse de tip Sana cu probiotice și prebiotice.

Factorii semnificativi selectați au fost: temperatura de fermentare de 37°C, raportul culturii probiotice:cultura Flora Danica de 2,0:1,0 și adaosul de făină de hrișcă 5% (m/v).

Numărarea selectivă a bacteriilor probiotice și a bacterii lactice mezofile

Viabilitatea celulelor culturilor probiotice LA-5® și *L. casei* 431® s-a determinat prin metoda de numărare indirectă, prin cultivare în condiții selective în MRS agar, după prepararea de diluții decimale în apă peptonată 0.1% (g/v) (ISO 8261 IDF122:2001).

Mediul selectiv pentru numărarea celulelor culturii probiotice LA-5® a fost MRS agar (Merk) suplimentat cu clindamicină (Sigma) și ciprofloxacina (Bayer) (BS ISO 20128:2006).

Inoculările din diluțiile succesive au fost realizate în câte două plăci Petri în paralel. Pentru numărare au fost alese plăcile Petri cu număr de colonii între 15 și 300. Rezultatele au fost raportate ca unități formatoare de colonii per ml produs fermentat (ufc/mL). Datele raportate reprezintă media a trei experimente diferite realizate în duplicat.

7.1.3. Rezultate și discuții

Evaluarea viabilității culturilor probiotice LA-5® și *L. casei* 431® în culturi multiple cu Flora Danica, în timpul păstrării produselor lactate fermentate timp de 3 săptămâni în condiții de refrigerare

Cultura probiotică LA-5® a demonstrat o supraviețuire diferită în produsele fermentate cu diferite combinații de culturi multiple (Figura 7.1.). Astfel, cultura probiotică LA-5® în combinația LA + FD are un grad sporit de menținere a viabilității celulelor pe durata a trei săptămâni de păstrare în condiții de refrigerare la temperatura de 4°C. În combinația LA + LC + FD, viabilitatea celulelor de LA-5® a înregistrat o scădere de 1 log ufc/mL, după 14 zile de păstrare și respectiv cu 1,5 log ufc/mL, după 21 de zile, numărul de celule de probiotice încadrându-se însă în limitele recomandate pentru un produs fermentat funcțional.

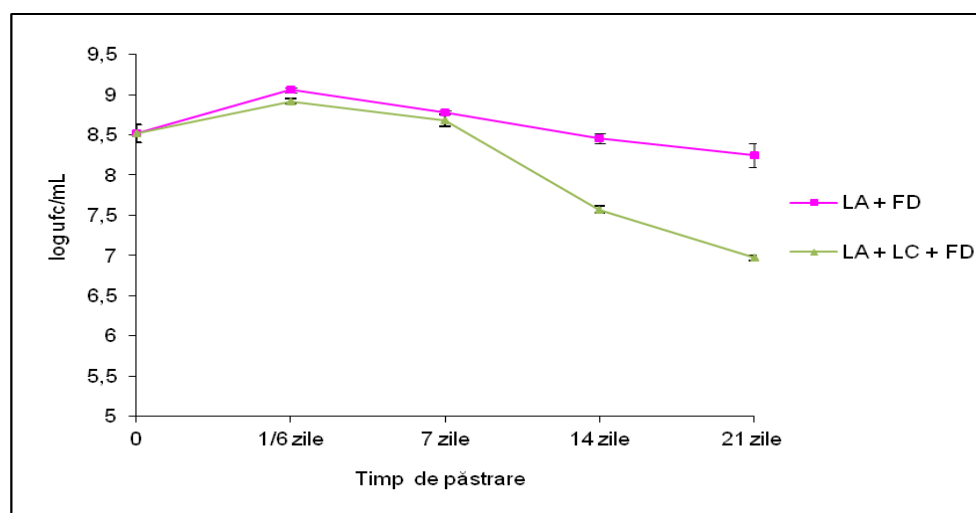


Figura 7.1. Dinamica menținerii viabilității celulelor culturii probiotice LA-5® (LA) pe perioada păstrării produselor fermentate cu culturi multiple, cu adaos de 5%, făină de hrișcă (FD - Flora Danica, LA - LA-5®, LC - *L. casei* 431®)

Stabilitatea culturii probiotice *L. casei* 431® la păstrarea timp de 21 de zile în condiții de refrigerare în probe fermentate cu cultura mezofilă Flora Danica și cu cultura probiotică LA-5® este prezentată în figura 7.3. Stabilitatea viabilității culturii starter *L. casei* 431® în timpul depozitării la temperatura de 4°C a produselor fermentate este evidentă în ambele produse analizate, respectiv produse fermentate cu culturi în combinațiile LC+FD și LC+LA+FD. Stabilitatea culturii probiotice *L. casei* 431® se poate datora efectului prebiotic al făinii de hrișcă.

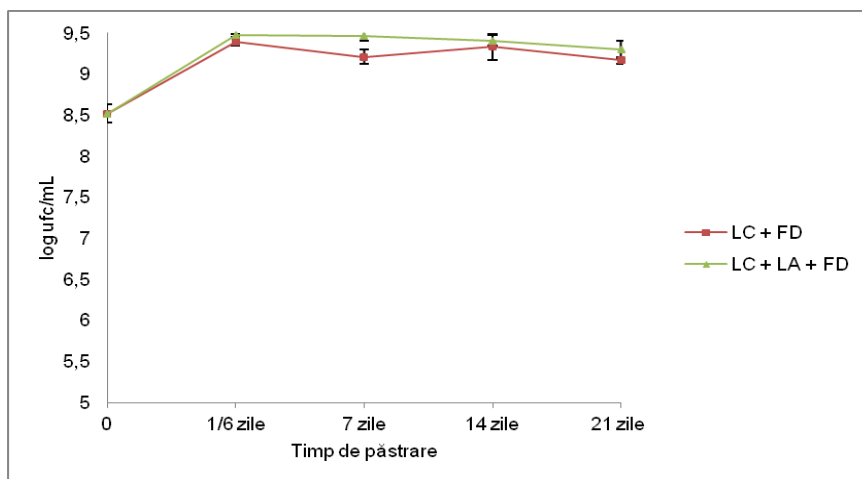


Figura 7.3. Dinamica menținerii viabilității celulelor culturii probiotice *L. casei* 431® (LC) pe perioada păstrării produselor fermentate cu culturi multiple, cu adaos de 5%, făină de hrișcă (FD - Flora Danica, LA - LA-5®, LC - *L. casei* 431®)

Stabilitatea culturii mezofile Flora Danica în produse lactate fermentate cu culturi multiple este redată în Figura 7.5. Scăderea viabilității culturii Flora Danica este foarte evidentă în produsul fermentat cu combinația de culturi FD+LA, comparativ cu cazul în care s-au utilizat combinațiile FD+LC sau FD+LC+LA. Din figură se observă o scădere a viabilității celulelor de 2,5 log ufc/mL, după 7 și 14 zile de păstrare, și respectiv o scădere de 3,5 log ufc/mL, după 21 de zile de păstrare.

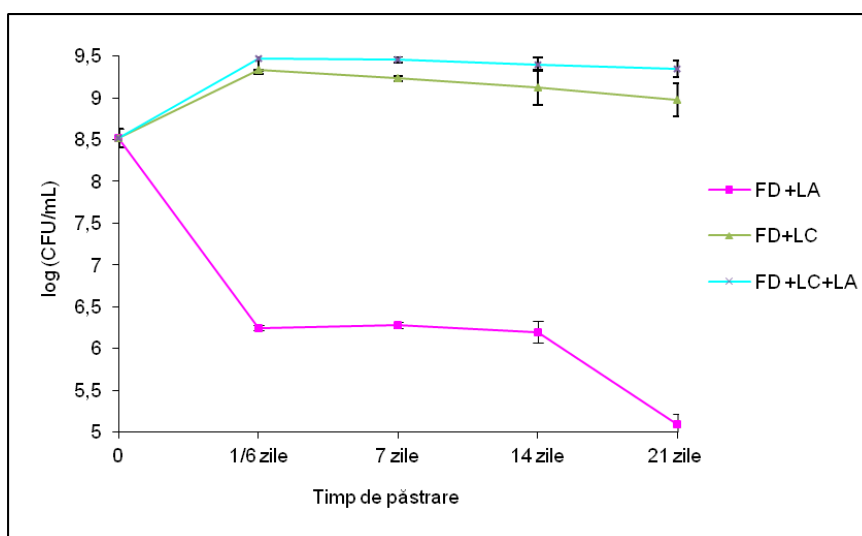


Figura 7.5. Dinamica menținerii viabilității celulelor culturii mezofile Flora Danica, pe perioada păstrării produselor fermentate cu culturi multiple, cu adaos de 5%, făină de hrișcă (FD - Flora Danica, LA - LA-5®, LC - *L. casei* 431®)

Scădere drastică a viabilității culturii mezofile Flora Danica în timpul păstrării s-a înregistrat în combinația FD+LA.

7.1.4. Concluzii parțiale

- În produsele tip Sana noi formulate obținute industrial la S.C. Almera International SRL Bacău a fost testată stabilitatea și viabilitatea culturilor probiotice LA-5® și *L. casei* 431® utilizate în amestecuri de culturi multiple, pe perioada termenului de valabilitate a produsului. Culturile probiotice și cultura mezofilă Flora Danica au prezentat un comportament diferit în multiplicare și creștere în perioada de fermentare și o evoluție diferită în ceea ce privește gradul de supraviețuire la depozitare prin refrigerare în produsele fermentate.
- S-a demonstrat că tulpina *L. casei* - 431® prezintă o rezistență superioară, în condițiile fermentative studiate testate, în toate combinațiile de culturi starter utilizate, ceea ce recomandă utilizarea acestei culturi starter pentru obținerea de produse probiotice tip Sana, în care și adaosul de 5% făină de hrișcă are un rol important.

7.2. Evaluarea prin spectrometrie de absorbție în infraroșu a compoziției produselor lactate funcționale fermentate, obținute la nivel industrial în condiții favorabile bacteriilor mezofile, cu culturi probiotice multiple și adaos de făină de hrișcă

Compoziția chimică a produselor lactate fermentate de tip Sana depinde, printre altele, și de interacțiunea activității metabolice și a funcționalității *in vitro* a culturilor starter mezofile și probiotice, când în mediul de fermentare s-a adăugat și prebioticul făină de hrișcă. În timpul fermentării, microorganismele implicate în procesul de fermentare produc o serie de compuși chimici ce conferă produsului caracteristici organoleptice unice. Unii dintre acești compuși pot fi considerați compuși bioactivi, iar alții reprezintă sursa de hrană pentru microorganismele ce lucrează în simbioză. Acești compuși pot fi analizați și dozați prin diverse metode instrumentale. Aceste metode au scopul de a identifica grupări funcționale din structura moleculelor compușilor organici bioactivi (acizi organici, CO₂, acetaldehidă, diacetil, aminoacizi esențiali, vitamine, minerale, etanol, peptide etc.) pentru demonstrarea caracterului funcțional al produsului lactat, dar sunt utilizate și în controlul de calitate al produselor.

Spectroscopia în infraroșu cu transformata Fourier (FTIR) este o tehnică simplă și rapidă, care monitorizează vibrațiile moleculare expuse de către diferiți compuși sub lumină infraroșie (Subramanian, 2009).

Analiza compozițională pentru a evidenția prezența compușilor bioactivi ce dau funcționalitate *in vivo* produselor lactate fermentate obținute la nivel industrial cu culturi multiple și adaos de prebiotic a reprezentat obiectivul analizei produselor lactate obținute la nivel industrial, după păstrare timp de 7 zile, la temperatura de 4°C, prin spectrometrie de absorbție în infraroșu .

7.2.2. Materiale și metode de analiză

Probe analizate

Codificarea probelor analizate este cea prezentată în subcapitolul 7.1.1. Probele nu au suferit nici o prelucrare suplimentară.

Principiile spectroscopiei FTIR

Spectrometria IR constă în măsurarea lungimii de undă și a intensității absorbției luminii în infraroșu de către o probă. Avantajul utilizării acestei tehnici constă în faptul că sunt necesare cantități mici de produs, timpul de analiză este scurt și structura produsului nu se modifică prin analiză. Este o tehnică de analiză ce nu necesită etapa de pregătire a probelor. Spectrele în IR sunt spectre de benzi cărora li se înregistrează conturul. În funcție de poziție, intensitate și formă, benzile de absorbție pot da indicații cu privire la tipurile de legături existente în moleculă.

Echipamentul utilizat

Analiza și înregistrarea spectrelor de absorbție în infraroșu s-a realizat cu spectrofotometrul Magna-IR Spectrometer 350 dotat cu HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance). Spectrele au fost înregistrate pe domeniul de lungimi de undă 900 - 4000 cm^{-1} și s-au identificat benzile de absorbție caracteristice tipului de legături și grupărilor funcționale specifice compușilor chimici urmăriți (exprimate în cm^{-1}).

Interpretarea rezultatelor

Pe baza studiilor din domeniu, există posibilitatea corelării poziției, intensității și a formei benzii cu anumite unități structurale plasate într-un anumit mod în moleculă. Identitatea unui compus organic poate fi stabilită pe baza identității spectrului său, deoarece nu există doi compuși organici cu același spectru (Bhatta et al., 2006).

7.2.3. Rezultate și discuții

Pentru interpretarea spectrelor FTIR obținute a fost necesară identificarea lungimilor de undă specifice compușilor de interes (Asimpolyos et al., 2004; Osborne et al., 2008). Astfel, pentru a caracteriza calitativ produsul finit, în perioada de depozitare a acestuia în condiții de refrigerare la temperatura de 4...6°C, timp de 7 de zile, au fost identificate și s-au considerat utile următoarele frecvențe caracteristice prezentate în tabelul 7.2. Așa cum se poate observa din acest tabel, aceste frecvențe corespund pentru compuși bioactivi importanți din compoziția produselor lactate nou formulate și anume: acidul lactic, oligoglucidele, glucidele fosforilate, fosfații, esterii, aromele, acizii grași și dioxidul de carbon.

În urma analizării spectrelor IR ale produselor lactate funcționale fermentate, obținute la nivel industrial cu culturi multiple și adaos de prebiotic, respectiv cultura mezofilă Flora Danica și culturile probiotice LA 5® și *L. casei* -431®, în combinațiile FD + LA, FD + LC și FD + LA + LC, comparativ cu produsul lactat fermentat doar cu Flora Danica, s-a constatat prezența mai multor benzi caracteristice, largi, intense, medii sau mici, specifice diferitelor grupări funcționale și caracterizate de frecvențele specifice acestora.

Tabelul 7.2. Diagrama benzilor IR care descrie compoziția produselor lactate fermentate nou formulate

FRECVENȚĂ, cm ⁻¹	Proba				Grupări funcționale caracteristice
	1	2	3	4	
3281,8 3276,2 3274,0					Grupări -OH,-OH asociat, -NO ₂ , compuși oxidrilici, compuși cu azot, acizi carbonilici
2929; 2928,1; 2924; 2923,5; 2920,9; 2853,1; 2852,2					Grupări -CH ₂ , =CH, catene hidrocarbonate
1742,9 1742,2					Grupări C=O, compuși carbonilici, acizi carbonilici
1634,9 1634,7 1631,5 1627,4					Grupări -HC=CH-, acizi nesaturați, Grupări -NH- aminoacizi
1539,6 1538,9 1538,7 1538,6					Grupări C ₆ H ₅ - aromatice, Grupări -NO ₂ compuși cu azot
1455,6 1454,7 1453,3					Grupări -NO ₂ compuși cu azot
1367,8 1338,1					Grupări -NH- aminoacizi, Gruparea C=O compuși carbonilici, acizi carbonilici
1239,8 1239,7 1239,0					Grupări -NH- aminoacizi, Gruparea C=O compuși carbonilici, acizi carbonilici
1173,9; 1155,1 1152,1 1150,9 1150,5					Grupări C ₆ H ₅ - aromatice, Grupări -OH compuși oxidrilici
1078,5 1078,2 1078,1 1077,5					Grupări C ₆ H ₅ - aromatice, Grupări -OH în compuși oxidrilici, Grupări C-C în eteri, Grupări S-H în compuși cu sulf, Grupări -NH- în aminoacizi
1024,2 1015,8 1000,0					Grupări C ₆ H ₅ - aromatice
928,8					Grupări -CH ₂ , =CH, catene hidrocarbonate Grupări C=O, compuși carbonilici

Legendă	Banda absenta	Banda ingusta	Banda medie	Banda intensa	Banda larga
----------------	------------------	---------------	-------------	------------------	-------------

Laptele are un aport mai ridicat în fosfați, nivelul acestora scăzând în produsul fermentat ca urmare a activității metabolice a bacteriilor starter. Tot o dovadă a desfășurării metabolismului bacterian este creșterea concentrației de glucide fosforilate în produsul finit.

Prezența fosfaților în probele FD și FD+LA+LC este atribuită frecvențelor de 928,8 și 929,8 cm^{-1} , în celelalte probe codificate FD+LA și FD+LC, aceste frecvențe lipsind ($<1000 \text{ cm}^{-1}$), absența fiind corelată cu prezența glucidelor fosforilate în produsul finit.

Prezența frecvențelor care pot fi atribuite acidului lactic, esterilor, compușilor de aromă și acizilor grași arată că sunt prezenți toți compușii specifici acestei categorii de produse lactate, compuși ce dau funcționalitate acestor produse.

Produsele lactate fermentate codificate FD+LA și FD+LC prezintă frecvențe cărora le sunt atribuiți compuși de aromă, respectiv de 1742,9 și 1742,2 cm^{-1} , comparativ cu produsele lactate fermentate codificate FD și FD+LA+LC, la care aceste frecvențe lipsesc.

Prezența acizilor grași denotă implicarea acestora în formarea compușilor de aromă caracteristici și totodată pot avea și rol antimicrobian, produsele lactate fermentate codificate FD+LA și FD+LC prezentând cele mai multe frecvențe cărora le sunt atribuite prezența acizilor grași.

7.2.4. Concluzii parțiale

- Prin tehnica FTIR s-a pus în evidență prezența grupărilor funcționale din structura moleculelor compușilor bioactivi din produsele lactate obținute la nivel industrial prin fermentare cu culturi multiple conținând tulpini probiotice și prebiotic (făină de hrișcă), pe durata perioadei de depozitare în condiții de refrigerare.
- Analiza spectrală FTIR a produselor lactate fermentate nou formulate obținute în condiții industriale a demonstrat existența unor diferențe clare între spectre, corelată cu tipul și combinația de culturi starter utilizate.
- Diferențele cele mai predominante ale spectrelor probelor analizate apar la frecvențele cuprinse între 1800 și 900 cm^{-1} și se corelează cu proprietățile biochimice ale culturilor utilizate în fermentarea probelor analizate.
- Produsele lactate fermentate nou formulate păstrează specificitatea categoriei de produse tip Sana, obținute în conformitate cu specificațiile tehnologice implementate în producția industrială; utilizarea de culturi starter probiotice și a produsului nutritiv și prebiotic făină de hrișcă contribuie la asigurarea caracterului funcțional. Caracterul funcțional este certificat preliminar prin prezența grupărilor funcționale din compoziția produselor fermentate analizate, care își păstrează stabilitatea biochimică și microbiologică în timpul conservării, pe toată perioada termenului de valabilitate.

7.3. Evaluarea transformărilor chimice și senzoriale ale produselor lactate funcționale fermentate, obținute la nivel industrial în condiții favorabile bacteriilor mezofile, cu culturi probiotice multiple și adaos de făină de hrișcă

Aroma produselor lactate fermentate este unul dintre cei mai importanți factori care influențează acceptabilitatea produselor, iar proprietățile senzoriale depind de echilibrul dintre componentele de aromă derivate din: grăsimi, proteine și carbohidrați (Cheng, 2010). Aroma distinctă a produselor lactate fermentate este influențată de acidul lactic și reprezintă un amestec complex de compuși care include substanțele volatile prezente în lapte precum și compușii specifici proveniți din fermentare (Tamime și Deeth, 1980).

În timpul depozitării, compușii volatili se pot transforma în funcție de tipul culturii de bacterii lactice și în funcție de condițiile de depozitare. Microorganismele, enzimele sau chiar reacțiile chimice care au loc în timpul depozitării pot afecta structura și stabilitatea produselor lactate fermentate producând alterări ale alimentelor. Producții secundare de aromă generați fac ca produsul să devină după un anumit timp impropriu consumului. Această evoluție și continuă transformare a compușilor volatili este cea care influențează în mod direct termenul de valabilitate al produselor lactate fermentate.

Dezvoltarea în ultimii ani a tehnicilor moleculare de analiză, cunoscute sub denumirea generică de metabolomică, din care fac parte și analiza gaz cromatografică și analiza FTIR, a permis studiul unor noi compuși sau chiar grupări funcționale ale unor compuși aflați în cantități foarte mici în matricea alimentară. Amprenta cromatografică a acestor produse poate să furnizeze informații valoroase despre formarea compușilor care dau gustul caracteristic al acestor produse, în strânsă legătura cu bacteriile lactice și transformările metabolice pe care acestea le produc.

Obiectivul acestui capitol l-a reprezentat obținerea unor produse lactate funcționale noi, de tip Sana, în condiții de fermentare mezofile, cu adaos de culturi probiotice *Lactobacillus acidophilus* LA-5® și *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* L.-*casei* -431® și făină de hrișcă în proporție de 5%, care să satisfacă cerințele consumatorilor privind proprietățile organoleptice (textura, gustul și aroma), apartenența la categoria de produse Sana și caracteristicile funcționale.

Evaluarea senzorială prin metoda degustării produselor cu un grup de paneliști antrenați, alături de evaluarea cromatografică, evaluarea unor transformări biochimice și analiza FTIR a produselor obținute au permis integrarea globală a rezultatelor și caracterizarea aromei complexe a produselor lactate fermentate obținute industrial.

Asocierea compușilor formați cu căile metabolice de lipoliză și glicoliză precum și evaluarea intensității proteolizei au reprezentat obiectivele specifice ale studiului.

Metoda OPA a fost folosită pentru a evalua gradul de proteoliză, ca indicator al activității și supraviețuirii culturilor probiotice, precum și ca indicator de dezvoltare de noi compuși în produs cu impact asupra caracteristicilor sale senzoriale și funcționale.

Analiza senzorială are scopul de a identifica preferințele consumatorilor și gradul de acceptare al produselor de către aceștia, precum și direcții de îmbunătățire a acestora în vederea unei posibile lansări pe piață a noilor produse.

Profilului de aromă al produselor obținute industrial a fost determinat prin metoda GC/MS-SPME, profilul de aromă al produselor lactate fermentate reprezentând un indicator valoros al calității și conformității produselor.

7.3.2. Materiale și metode de analiză

Pregătirea probelor

Probele analizate au fost reprezentate de produsele lactate fermentate noi, obținute industrial, prin fermentare în condiții mezofile, respectiv cu cultura mezofilă Flora Danica și culturi probiotice LA-5® și *L. casei* 431® și adaos de făină de hrișcă 5% (g/v).

Combi-națiile au fost în cultură dublă, FD + LA și FD + LC, sau în cultură multiplă, FD + LA + LC.

Materiale

- Probele de produse noi obținute industrial,
- Sticlărie de laborator: baloane cotate de 100 ml, pipetă de sticlă, fiole cu dop,
- Fișe de analiză senzorială (Anexa 2).

Reactivi

- acid tricloracetic (TCA) 0,75%; dodecil sulfatul de sodiu (SDS); Borax-tetraborat de sodiu decahidrat $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ (THB Na); OPA (o-ftalaldehidă); alcool metilic; β mercaptoetanol

Echipamente de laborator

- Pipetă automată de 150 μl ; Balanță analitică; Spectrofotometru UV-Vis Cintra 202 și Software-ul Cintral; Gaz cromatograf tip Trace GC Ultra cuplat cu Spectrometru de masă cu trapă ionică ITQ 900, produse de compania Thermo Scientific.

Metode de analiză

Metoda OPA

Activitatea proteolitică a culturilor utilizate în obținerea loturilor experimentale a fost evaluată prin măsurarea grupelor aminice libere ale aminoacizilor și peptidelor formate ca urmare a proteolizei, ca diferență între absorbanta la 340 nm a probei martor și a probei de analizat. Proba martor a fost considerată proba de lapte, nefermentată.

Analiza senzorială

S-a urmărit efectuarea analizei senzoriale a diferitelor probe de Sana, cu ajutorul echipei de paneliști.

Alegerea tipului de analiză și a sistemului de prelucrare a datelor: S-a utilizat o metodă de analiză senzorială bazată pe aprecierea cu ajutorul unei scale hedonice, cu număr impar de valori (metoda Likert). Această *metodă a punctajului* presupune atribuirea unui punctaj pentru a cuantifica experiența senzorială. Metoda este simplă și are capacitatea de a reflecta însușirile senzoriale ale produselor, fiind totodată adecvată pentru stabilirea preferințelor consumatorilor. Punctajul reprezintă aplicarea scorului, sau a aprecierilor convertite în valori numerice, pentru a descrie intensitatea unei experiențe senzoriale percepute. Metoda punctajului prezintă o serie de avantaje și dezavantaje:

Avantajele metodei punctajului:

- ☞ permite caracterizarea unui număr mare de proprietăți senzoriale ale produsului
- ☞ simplitate
- ☞ claritate
- ☞ ușurința în apreciere
- ☞ ușurința de prelucrare a rezultatelor prin metode statistice.

Dezavantajele metodei punctajului:

- nu dă rezultate destul de precise atunci când este vorba de detectarea unor gusturi străine
- lipsa de precizie
- caracterul arbitrar al punctajelor

Deoarece în acest caz avantajele sunt mai mari decât dezavantajele, metoda selectată a scării de punctaj Likert a fost aplicată pentru analiza senzorială a produselor lactate fermentate noi formulate, obținute industrial.

Un rol important în analiza senzorială îl are modul de selectare și instruire al degustătorilor.

Criteriile aplicate pentru selectarea paneliștilor

- Persoanele selecționate au fost împărțite în 2 grupuri, sub 35 ani și peste 35 de ani
- S-au recrutat numai persoane disponibile și voluntare
- Persoanele implicate în analiză sunt atât de gen feminin cât și masculin
- Participanții sunt capabili să descrie exact și precis senzațiile
- Echipa de degustători, după selectare, a fost instruită corespunzător.

Procedura: Analiza senzorială a fost efectuată de paneliști selecționați și antrenați. După o prealabilă instruire, fiecare degustător a primit fișa de analiză senzorială (Anexa 2) și proba supusă analizei. După ce s-au stabilit condițiile optime pentru desfășurarea analizei, s-au pregătit probele. Codificarea probelor s-a făcut astfel încât să nu dea degustătorului nici o idee despre identitatea lor și să nu inducă nici o idee preconcepută. S-au folosit numere formate din 3 cifre, fără a se introduce cifrele 1 sau 9. Paneliștii au primit pahare de unică folosință, de culoare albă, codificate în acord cu proba pentru fiecare sortiment analizat. Paneliștii au citit buletinul de analiză și l-au completat corespunzător, conform senzațiilor percepute de organele de simț. Parametrii evaluați de degustători sunt prezentați în figura 7.16 și definiți în continuare.

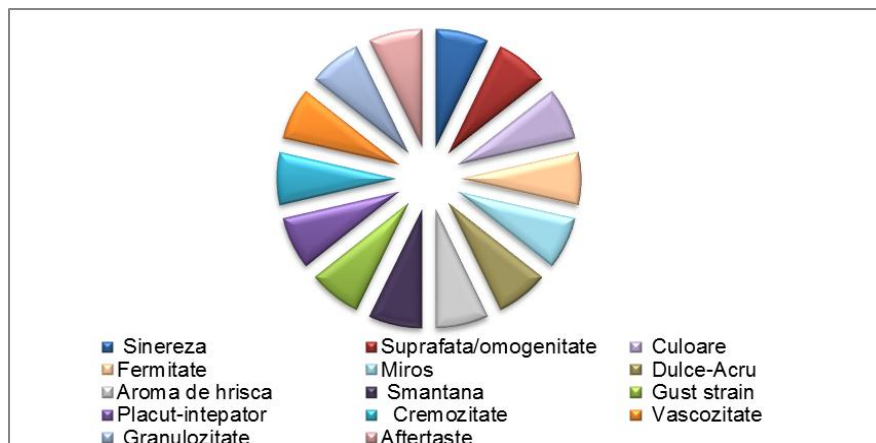


Figura 7.16. Parametrii menționați în fișa de analiză senzorială (Anexa 2)

Definirea termenilor:

Sinereză = fenomenul de separare a fazelor; pe suprafața produsului lactat se observă vizual separarea zerului de coagul;

Suprafață/omogenitate = însușirea de a avea aceleași proprietăți în toate punctele sale, de a fi uniformă;

Culoare = se va observa vizual nuanța produsului lactat fermentat; în cazul produsului supus analizei nuanța va fi bine pronunțată, de alb spre crem-gălbui, datorată adaosului de hrișcă;

Fermitate = rezistența la presiunea externă aplicată produsului; stabilitate, păstrarea formei; se ia o linguriță din produs și se așează peste produsul din pahar - se urmărește dacă și cât timp își păstrează forma.

Miros = se vor inhala compușii volatili eliberați; mirosul trebuie să fie plăcut, caracteristic unui produs lactat fermentat, ușor înțepător, cu o notă de hrișcă, fără miros străin;

Dulce-Acru = se va aprecia cât de acru este produsul;

Aroma de hrișcă = se vor observa separat aspectul și gustul de hrișcă (plantă ierboasă granulară); ulterior se va sesiza în produsul lactat fermentat intensitatea aromei de hrișcă;

Smântâna = gust & aromă specifice de smântână;

Gust străin = orice gust neplăcut, diferit de cel caracteristic de produs lactat acid și hrișcă;

Plăcut-înțepător = caracteristică dată de culturile lactice utilizate; formarea gazului cu aspect de bule unitare condiționate de microflora normală, sesizabile în cavitatea bucală; se va urmări senzația răcoritoare, înțepătoare la limbă;

Cremozitate = senzație de catifelat, moale, o anume rezistență la înghițire;

Vâscozitate = caracteristică ce oferă produsului rezistență la curgere, consistență;

Granulozitate = prezența particulelor mai mari de coagul; lipsa de finețe a coagului;

Aftertaste = *Gust remanent* = senzația ce persistă în cavitatea bucală câteva secunde după ce produsul a fost înghițit.

Metoda de analiză statistică

În analiza senzorială și în evaluarea profilului de aromă a fost utilizată, ca metodă de analiză statistică, Analiza Componentului Principal, tehnica de analiză multivariată. Software-ul utilizat este Unscrambler X (versiunea 9.7) produs de Camo, Norvegia.

Determinarea profilului de aroma prin metoda GC/MS- SPME

Metoda de lucru utilizată este gaz-cromatografia cuplata cu spectrometrie de masa utilizând microextracția din fază solidă (SPME). Pentru analiza cromatografică s-a folosit un gaz cromatograf tip Trace GC Ultra cuplat, pentru detectarea compușilor, cu un spectrometru de masă cu trapă ionică ITQ 900 produse de firma Thermo Scientific .

7.3.3. Rezultate și discuții**Evaluarea activității proteolitice a culturilor Flora Danica, La5® și L. casei® prin analizarea produselor noi fabricate prin metoda OPA**

Proteoliza produsă de bacteriile probiotice și bacteriile lactice a fost evaluată după fermentare, în timpul depozitării produselor în condiții de refrigerare.

Așa cum se poate observa din figura 7.17, după primele șapte zile de depozitare apare o ușoară scădere a grupărilor aminice libere pentru probele 1, 2 și 3, respectiv FD, FD+LA și FD+LC. Acest lucru se poate datora consumului de aminoacizi de către culturile de bacterii lactice în prima fază post fermentare. Singura probă în care apare clar o creștere a proteolizei este proba 4, FD+LA+LC, pentru care se înregistrează în ziua a șaptea o creștere cu 10% a proteolizei.

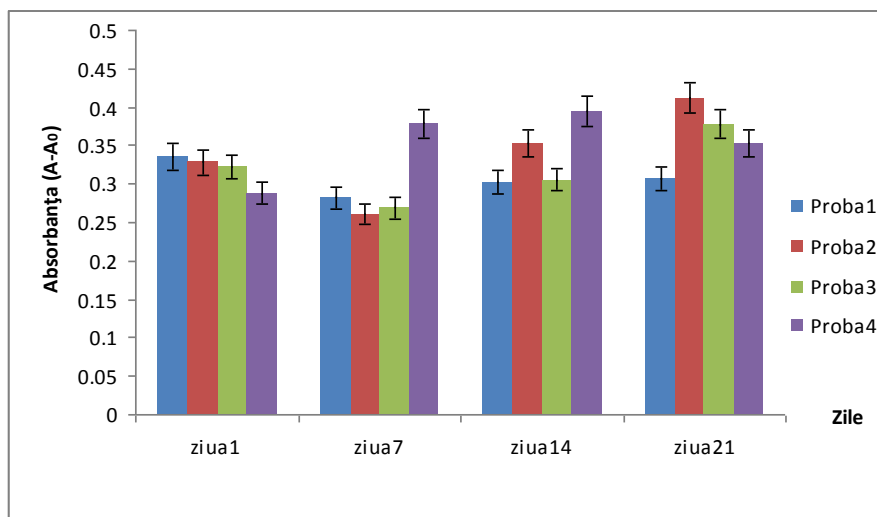


Figura 7.17. Variația activității proteolitice pe durata termenului de valabilitate al produselor

În ceea ce privește proteoliza, în timpul întregii perioade de depozitare a produselor lactate fermentate, s-a constatat că proteoliza în Proba 1 formată din lapte, hrișcă și Flora Danica a variat în unități mici, aproape nesemnificativ, pe parcursul celor 21 de zile.

Proba 2, FD+LA, a avut în ziua a 14-a o creștere a proteolizei cu 9% ; din ziua 14 și până în ziua 21 activitatea a crescut cu 58% față de ziua a șaptea.

Proba 3, FD+LC, a avut o valoare a proteolizei în ziua a 7-a mai scăzută, dar ulterior a crescut succesiv până în ziua 21 cu 40% față de ziua a șaptea.

Proba 4, FD+LA+LC, în ziua 7 a avut cea mai mare creștere a valorii proteolizei. Ulterior, până în ziua 21, proteoliza a crescut constant. Creșterea proteolizei din ziua 1 până în ziua 21 a fost realizată cu aproximativ 23%.

Rezultatele experimentale demonstrează că adăugarea de bacterii probiotice în probele 2, 3 și 4 crește nivelul proteolizei, fapt pus în evidență și de alte cercetări (Donkor și al., 2006). Cea mai mare creștere are loc în proba 4 în care s-au adăugat ambele culturi probiotice: LA-5® și *L. casei* 431®. De asemenea, adaosul de tulpini probiotice puternic proteolitice a determinat creșterea numărului de grupări aminice libere, iar nivelul crescut al proteolizei sugerează o rată de supraviețuire mai bună a microorganismelor.

Analiza senzorială a produselor noi fabricate industrial

Au fost luate în analiză două categorii de degustători: cu vârstă peste 35 de ani și sub 35 de ani deoarece se știe că preferințele sunt de multe ori influențate de vârsta consumatorilor.

De asemenea, s-a luat în calcul faptul că degustătorii tineri au o preferință mai mare pentru produsele dulci, de tip desert, și prin urmare aceștia ar putea să nu aprecieze produsele fermentate cu un gust acid pronunțat.

Atributele senzoriale medii ale probelor P1-P4 pentru grupa de degustători peste 35 ani sunt prezentate în diagramele-radar de mai jos (figura 7.18).

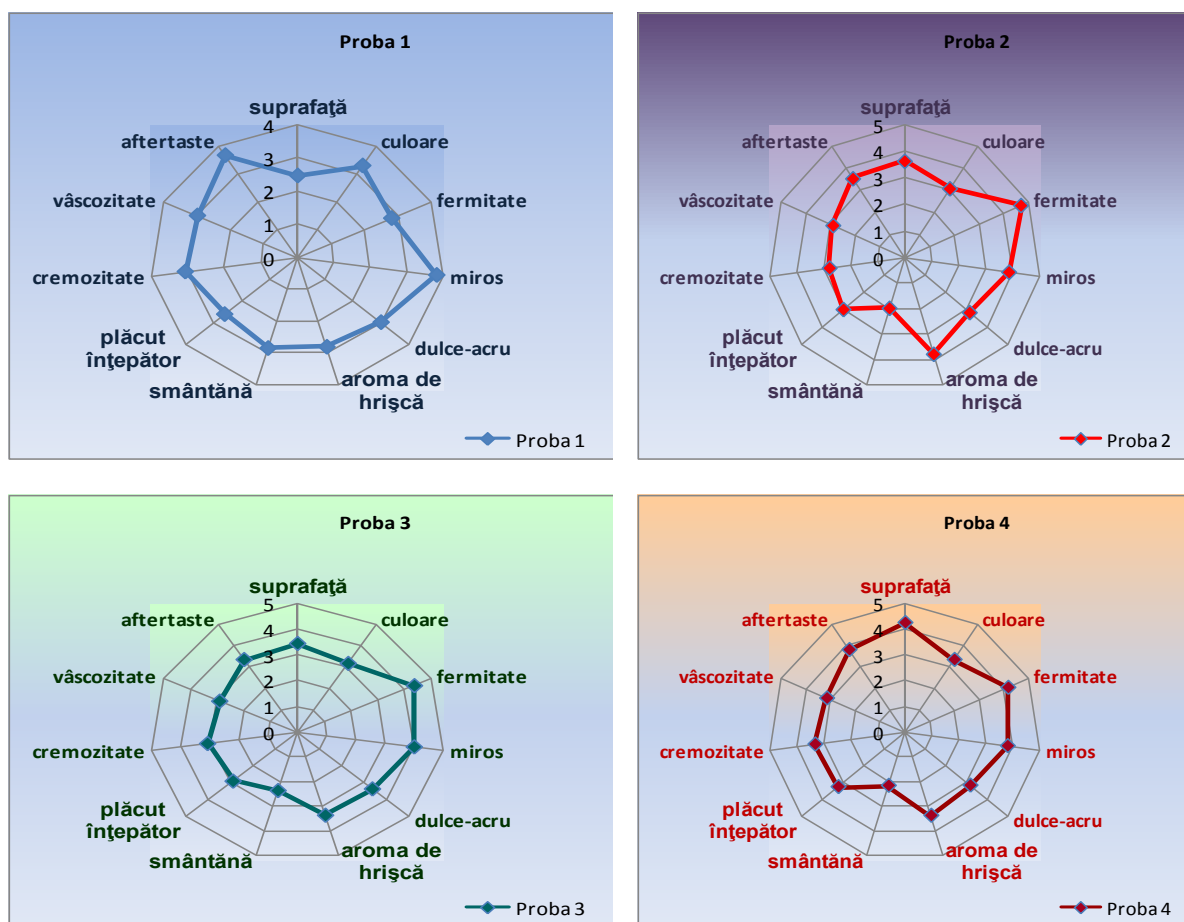


Figura 7.18. Atributele senzoriale medii ale probelor P1-P4 pentru grupa de degustători peste 35 ani

Din centralizarea rezultatelor pentru degustătorii peste 35 ani, la aspect, punctajul maxim a fost obținut de proba 2, urmată de proba 4, pe ultimele două locuri situându-se probele 3 și 1 (tabelul 7.5). La proba 1 s-a observat punctaj maxim la sinereză, valoare antagonică având proba 4 (punctaj minim la sinereză). Acest rezultat se corelează și cu observația anterioară că nivelul cel mai mare de proteoliză a fost prezent de asemenea în proba 4. Culoarea a fost apreciată cu aproape același scor, nefiind diferențe considerabile între rezultate pentru aprecierea acestui indicator (figura 7.18).

Tabel 7.5. Rezultate medii ale principalelor atribute pentru grupa de vârstă peste 35 de ani

Grupa de vârstă peste 35	proba1	proba2	proba3	proba4
Aspect	3,07	3,22	3,11	3,18
Miros și gust	1,91	2,20	1,95	2,13
Textura și mouthfeel	1,06	0,70	0,97	1,24
Aftertaste	3,64	3,55	3,36	3,82

La categoria miros și gust, în medie, a fost preferată proba 2, urmată de proba 4, proba 3 și proba 1. Atributul negativ, gustul străin, a fost luat în analiză cu valoare negativă. S-a constatat că paneliștii au sesizat la toate probele gust străin, dar cel mai puternic l-au remarcat la proba 3,

cauzat cel mai probabil de aciditatea pronunțată și de gustul de hrișcă. Punctajul cel mai mare a fost obținut de proba 4, urmată descrescător de probele 1, 3 și 2.

Punctajul pentru proba 4, cea mai bine cotate, a fost de două ori mai mare față de proba 3.

Din analiza componentului principal se observă că primul component principal, PC1, explică 86,8 % din variația totală. Proba 2 influențează cel mai mult PC1 și are scorul cel mai mare, urmată îndeaproape de proba 4. Prin urmare putem considera că proba care a obținut cel mai mare punctaj a fost proba nr. 2, urmată de proba 4.

Grupa de paneliști cu vârsta sub 35 de ani nu a sesizat diferențe prea mari între probe.

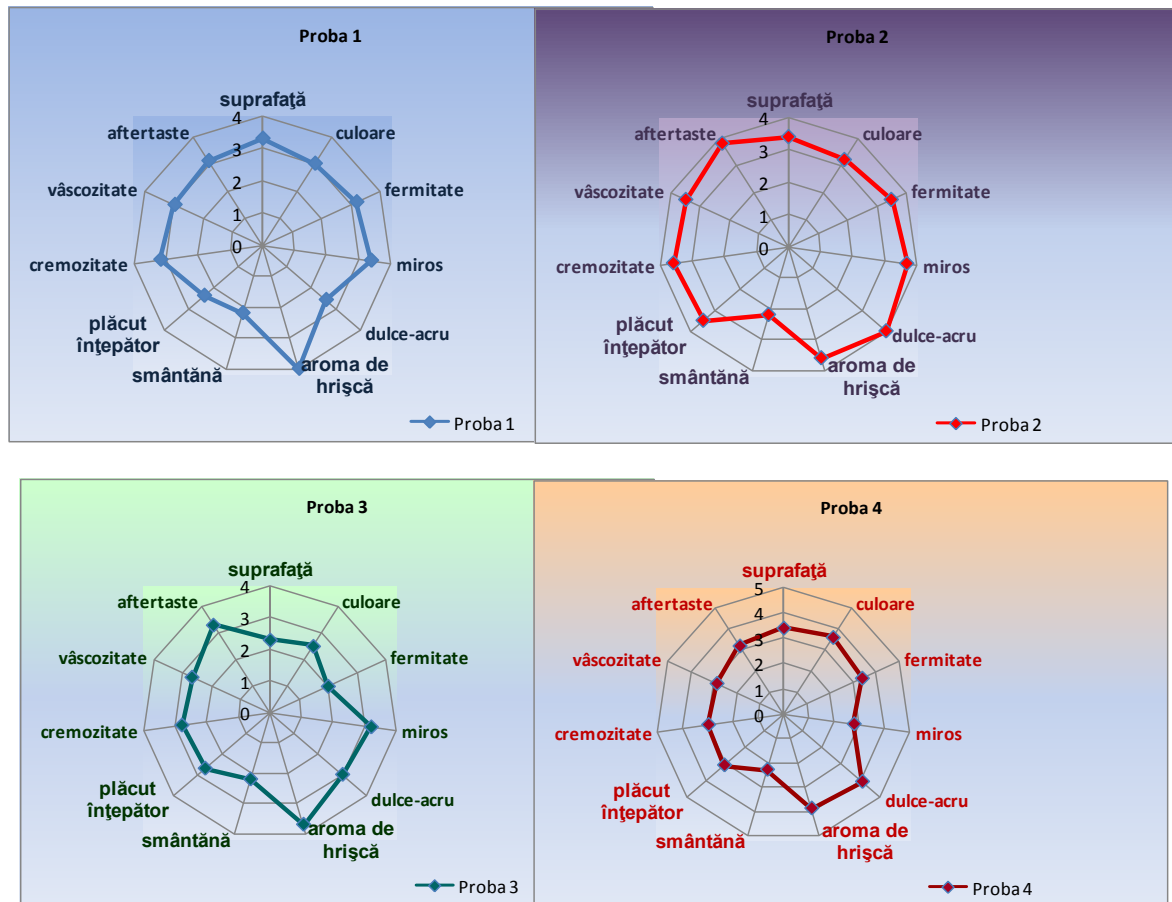


Figura 7.20. Atributele senzoriale medii ale probelor P1-P4 pentru grupa de degustători sub 35 ani

Din centralizarea rezultatelor obținute pentru degustătorii cu vârstă sub 35 ani, la aspect punctajul maxim a fost obținut de proba 2, urmată de proba 4, pe ultimele două locuri situându-se probele 3 și 1 (figura 7.20.). La proba 1 s-a notat punctaj maxim la sinereză, la fel ca pentru categoria de degustători peste 35 de ani, valoare antagonică având proba 4 (punctaj minim la sinereză).

Culoarea a fost apreciată cu aproape același scor, nefiind diferențe considerabile între rezultate pentru aprecierea acestui indicator.

La categoria miros și gust, a fost preferată proba 2, la egalitate cu proba 4, urmate de probele 1 și 3 (Tabelul 7.6). Atributul negativ, gustul străin, a fost luat în analiză cu valoare negativă. S-a constatat că paneliștii au sesizat la toate probele gust străin, dar cel mai puternic l-au remarcat la proba 3, cauzat cel mai probabil de aciditatea pronunțată și de gustul de hrișcă.

Tabel 7.6. Rezultate medii ale principalelor atribute pentru grupa de varsta sub 35 de ani

Grupa de vârstă sub 35	proba1	proba2	proba3	proba4
Aspect	3,46	3,13	2,46	3,14
Miros si gust	2,08	2,44	2,06	2,44
Textura si mouthfeel	1,333	1,233	0,667	0,633
Aftertaste	3,1	3,8	3,2	3,2

Așa cum se poate observa și în acest caz, proba 2 este cea care influențează cel mai mult componentul principal 1, care explică 97% din variația totală. Proba 4 este foarte apropiată de proba 2 în preferințele consumatorilor sub 35 de ani, ca și în cele ale celor peste 35 de ani. Proba 1 influențează mult componentul principal 2, care explică doar 2% din variația totală.

Prin urmare cele două grupe de consumatori au apreciat că produsul 2 se află în fruntea preferințelor, iar acesta este urmat foarte îndeaproape de produsul 4.

Analiza profilului de aroma al produselor noi obtinute industrial prin utilizarea metodei GC/MS

Compusul cu ponderea cea mai mare dintre toți compușii volatili analizați este o etilcetonă (figura 7.23). Ionii reprezentativi sunt 233, 247, 263. Timpul de retenție este 21.02 min.

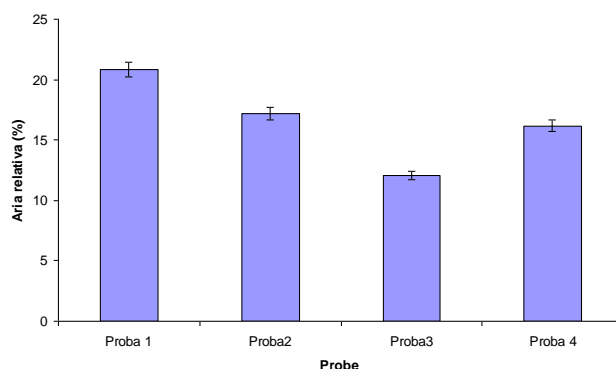


Figura 7.22. Conținutul procentual de etil cetonă în cele patru probe, în prima zi după fermentare

Această etilcetonă se găsește în prima zi după fermentare în toate cele patru probe analizate (figura 7.22.), dar conținutul cel mai mare este în proba 1 (20,83%), urmată de probele 2 și 4 cu 17,2% respectiv 16,16% etilcetonă. La timpul de retenție 28,54 minute a apărut și o carboxialdehidă (figura 7.24) având următorii ioni cu abundența cea mai mare: 89, 133, 277, 354.

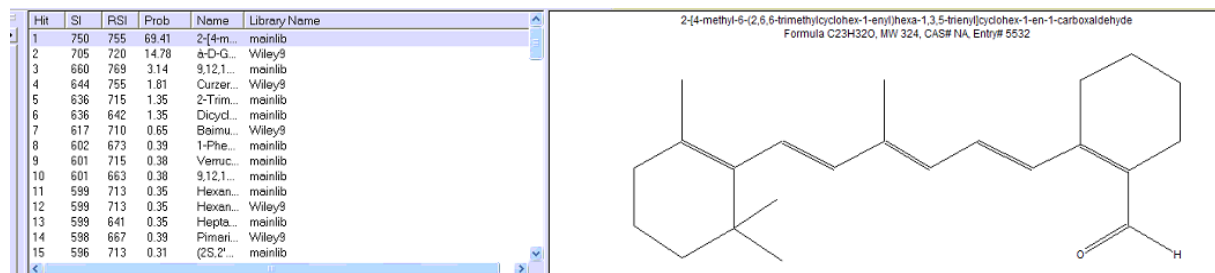


Figura 7.24. Ciclohexa-Carboxialdehida

Prin analiza efectuată s-a identificat un număr relativ redus de compuși carbonilici, dinamica acestora în probe fiind reprezentată în figura 7.25. În toate cele patru probe, în primele șapte zile de depozitare se constată o creștere a conținutului total de compuși carbonilici.

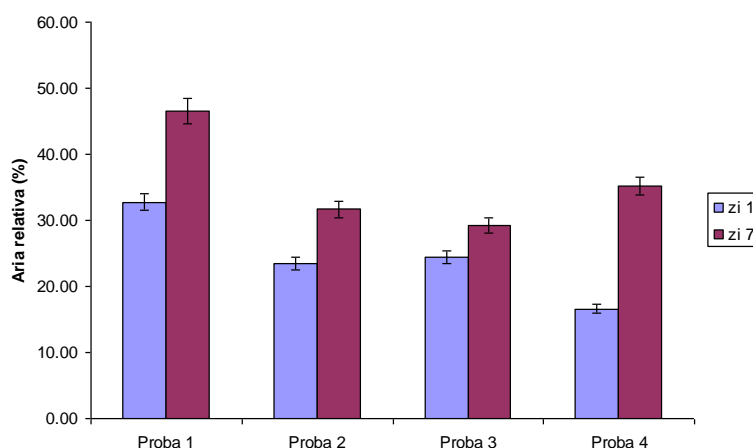


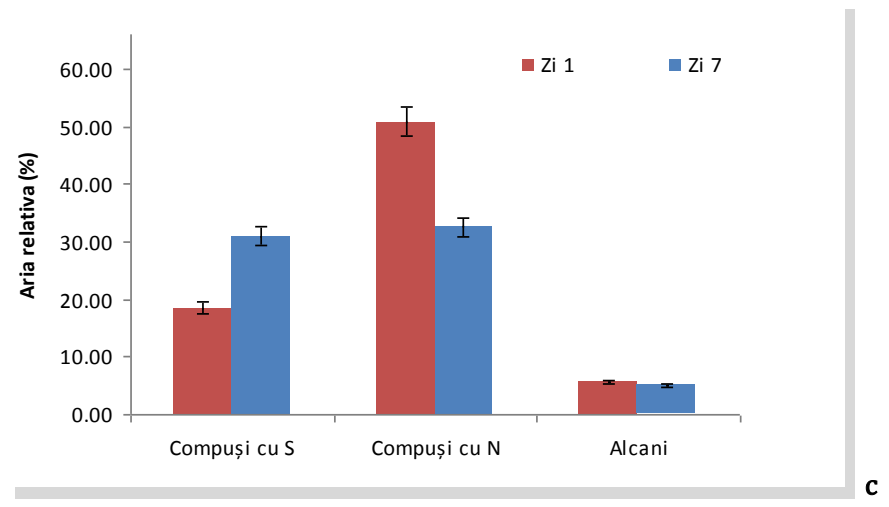
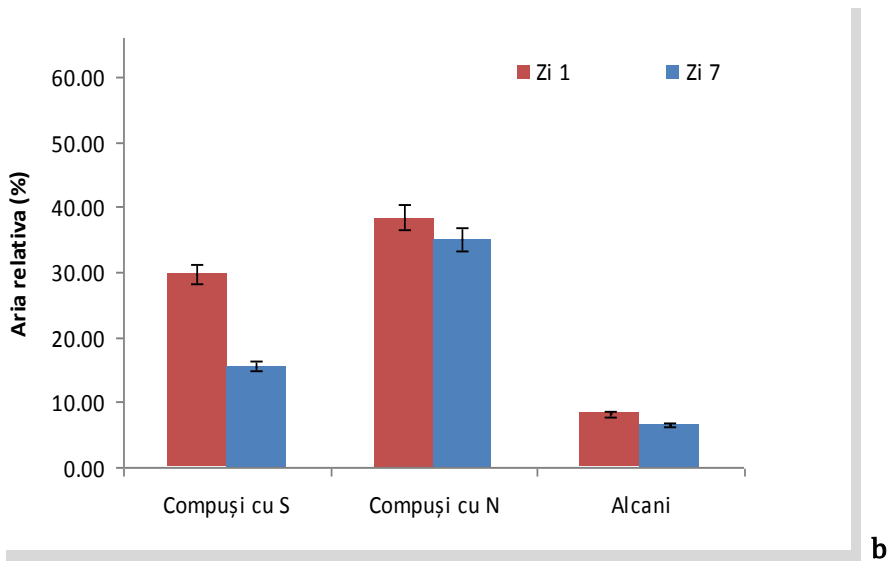
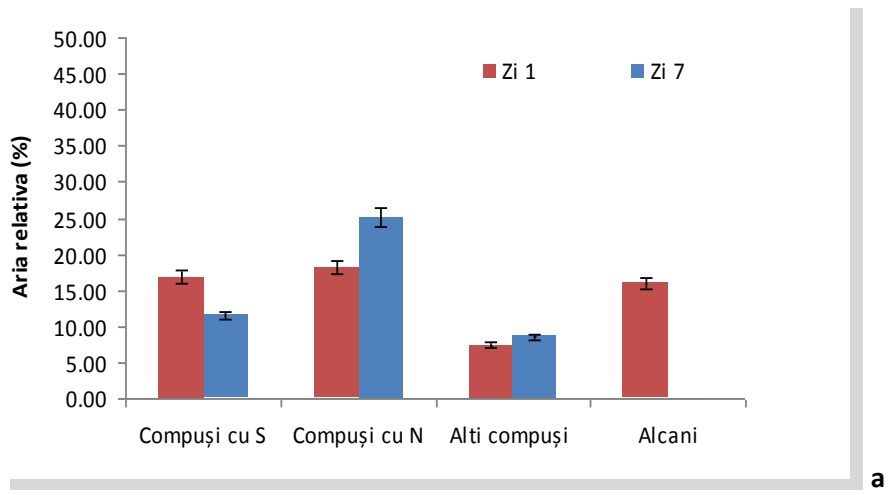
Figura 7.25. Dinamica procesului de maturare a gelurilor lactice, exprimată prin intermediul compușilor carbonilici

Cea mai mare creștere poate fi observată pentru proba nr. 4 (cu 18,53% mai mult în ziua 7 față de prima zi), iar cea mai redusă creștere pentru proba nr. 3 (cu 4,86% mai mult în ziua 7 față de prima zi). Faptul că în proba 2 cantitatea de compuși carbonilici este mai mare poate fi corelat cu capacitatea lui La 5® de a produce mai mulți compuși de aromă decât *L. casei-431*®. Creșterea în ziua a șaptea ar putea fi explicată prin continuarea proceselor fermentative pe durata depozitării produselor, chiar dacă viteza de fermentare este mult mai redusă comparativ cu etapa de termostatare propriu-zisă. Analiza SMPE a pus în evidență doar compuși cu funcțiune mixtă care au avut și grupe hidroxil în componență, iar pentru lactone a fost identificată o ciclohexa- carboxialdehidă (figura 7.24) care ar putea fi un intermediar în sinteza unor lactone.

Cea mai mare provocare pe care o reprezintă identificarea compușilor de aromă în produsele lactate este generată de conținutul mare de lipide, proteine și carbohidrați care fac dificilă separarea compușilor volatili doar pe baza volatilității acestora.

Cu toate că este dificilă interpretarea compușilor volatili obținuți prin tehnica SPME, această metodă prezintă avantajul că permite o cartografiere a componentelor majore de aromă ale produselor lactate fermentate și oferă posibilitatea comparării amprentelor compușilor volatili obținuți în diferite condiții de procesare, fără însă a facilita o identificare și caracterizare completă a compușilor volatili prezenți în gelul lactic.

Un alt mecanism important de care trebuie să se țină cont în analiza compușilor volatili este cel al reacțiilor Maillard care generează numeroși compuși intermediari de sinteză și care conduc la apariția unor compuși cu sulf și cu azot din clasa pirolilor, a furanilor, a indolului și alții (figura 7.26 a-d).



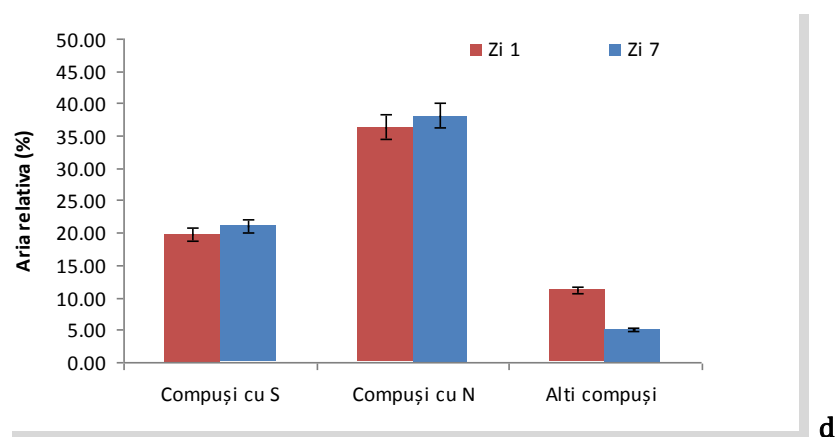


Figura 7.26. Compoziția procentuală a compușilor cu sulf, cu azot, a alcanilor și a unor precursori ai hormonilor în probele 1 (a), 2 (b), 3 (c) și 4 (d)

Compușii cu azot și sulf se formează ca urmare a proteolizei catalizate de enzimele microbiene și, în același timp, compușii nou formați servesc ca sursă de hrană pentru bacteriile lactice. Așa cum se poate observa din figurile 7.26a, 7.26.b, 7.26c și 7.26d, compușii cu sulf și cu azot variază semnificativ în probele 1 și 3, iar în proba 4 se înregistrează diferențe semnificative după 7 zile de depozitare numai pentru compușii cu sulf. Nivelul ridicat al proteolizei, observat printr-o concentrație crescută de compuși cu azot și sulf, poate fi explicat pentru proba 4 de numărul mare de celule din proba 4 și poate fi corelat cu rezultatele obținute prin metoda OPA. În proba 2, cu toate că se observă o creștere ușoară a concentrației de compuși cu S și cu N, diferențele înregistrate nu sunt semnificative între prima și a șaptea zi. De asemenea, se observă că pentru proba 2 concentrația totală de compuși volatili cu sulf și azot este mai mare decât în proba 1, atât în prima cât și în a șaptea zi de depozitare. Cel mai mare procent de compuși cu azot și sulf se găsesc în proba 3 care are un conținut total de 69,53% în prima zi și de 63,67% în ziua a șaptea. Acesta este justificat de numărul mai mare de celule din proba 3, comparativ cu proba 2. De asemenea, această concentrație mare de compuși volatili cu azot și sulf poate fi explicată de un echilibru mai bun între cantitatea formată și cea consumată, ca sursă de hrană, de către bacteriile lactice din proba 2. Se știe că *L. acidophilus* se adaptează mai greu și are o rată de supraviețuire mai redusă în produse lactate comparativ cu *L. casei*, deoarece acesta nu este de originar din lapte. Proteoliza mai intensă ar putea să explice acceptabilitatea mai redusă de către consumatori a probei 3 comparativ cu proba 2. Nu numai aspectul probelor poate fi influențat de producția de reacție Maillard, gustul neplăcut al compușilor cu S sau al altor compuși din clasa furanilor și a piranilor putând să justifice diferențele apărute în decizia de acceptare a acestor produse.

Profilul compușilor volatili din proba 4 prezintă o concentrație asemănătoare de compuși cu N și S (68,31%) în prima zi de depozitare ca și proba 3, dar o concentrație mai mică cu 13,11% comparativ cu proba 3 în a șaptea zi de depozitare.

Un derivat al indolului se formează la 7 zile în proba 1, $C_{18}H_{15}NO_2$, la timpul de retenție 0,77 și are ionii reprezentativi 277, 278 și 279 (figura 7.28).

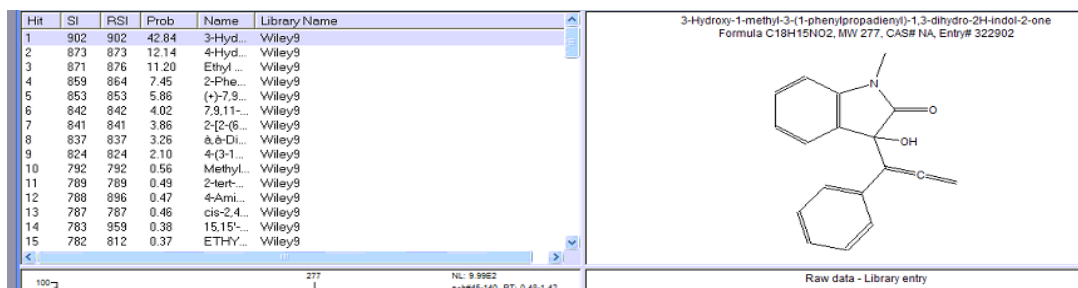


Figura 7.28. C₁₈H₁₅NO (derivat indol)

În ziua a 7-a în proba 1 s-a mai format un derivat al furanului C₁₄H₁₄O₃ (figura 7.29) având ionii reprezentativi 149, 233, 167 și 104. Acesta este probabil să fi apărut în timpul reacțiilor Maillard care au avut loc la tratamentul termic al laptelui – materie primă pentru produsul lactat fermentat sau este posibil să se fi format în timpul desorbției compușilor de pe fibra SPME în injectorul gaz cromatografului.

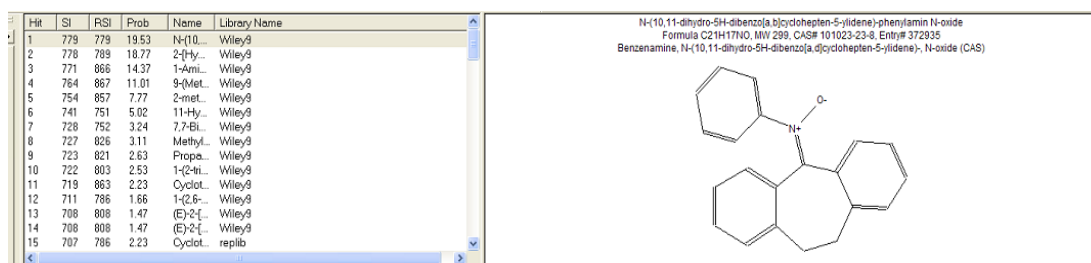


Figura 7.29. C₁₄H₁₄O₃ (derivat furan)

Reprezentantul dionelor (figura 7.30) este un compus din clasa furanilor, dar este de remarcă în acest caz probabilitatea foarte mică care i-a fost atribuită la compararea spectrelor ionilor reprezentativi cu spectrele bibliotecii Wiley.

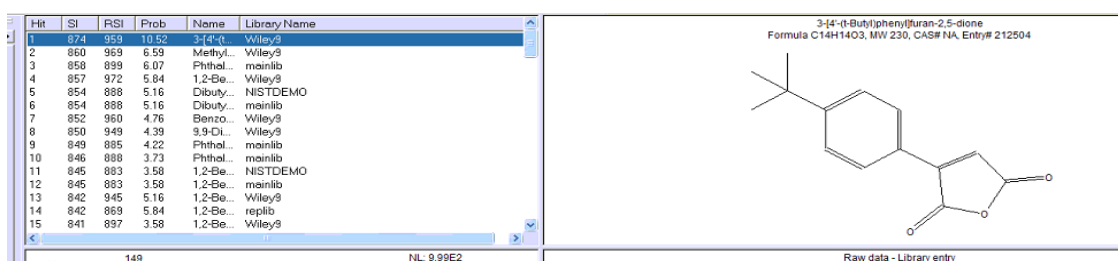


Figura 7.30. Diona

Acest compus prezent în probe este probabil să fi apărut ca urmare a transformărilor de metabolism suferite de lipidele din lapte.

Dintre compușii mai puțin întâlniți se remarcă prezența unor precursori ai hormonilor cuplați cu tiocianoderivați, cum sunt 1,2-etandiol acetat, (5a)-coleston-3-ona, ciclică CAS), gigantina, lucenina 2, precum și compuși cu valoare fiziologică mare cum sunt normetadolul și secobarbitalul care pot să provină din proteoliza proteinelor din lapte care conduc la apariția peptidelor bioactive care ulterior se pot asocia cu acizi carboxilici.

Analiza comparativă a celor patru probe după prima zi de fermentare, efectuată cu ajutorul metodelor statistice multivariate, arată că sunt patru componente principale după care poate fi

împărțită variația compoziției compușilor volatili din cele 4 probe (figura 7.35). Proba 4 este influențată semnificativ de componentul principal PC4, responsabil pentru 18% din variația totală. În figura 7.35 se observă că proba 2 este influențată de PC2, proba 1 de PC1 și proba 3 de PC3. Practic, așa cum poate fi observat, probele își distribuie variația totală, fiecare după câte un component principal.

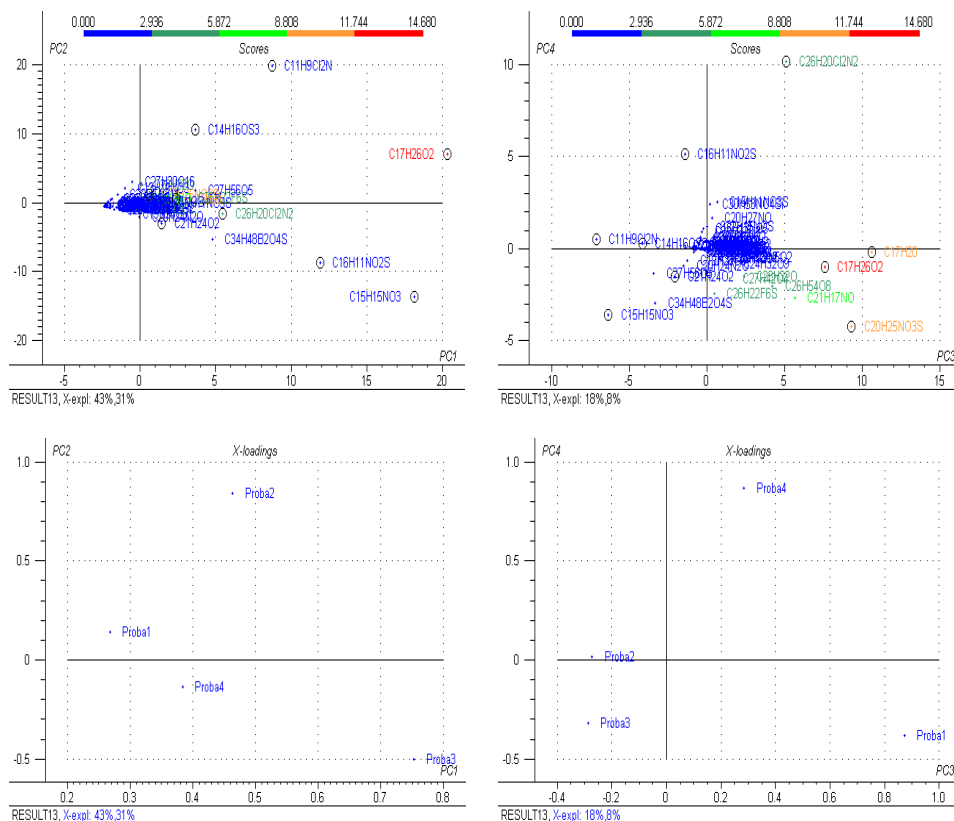
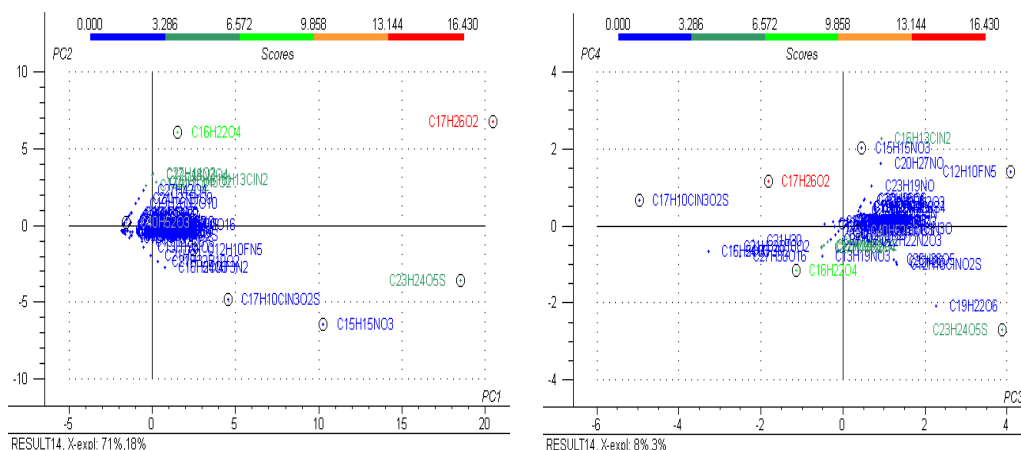


Figura 7.35. Gruparea de tip cluster a compușilor pentru probele de Sana și influența componentelor principale

Așa cum se observă în figura 7.36 în ziua a 7-a de depozitare profilul de aromă se modifică; în cazul probei 1 crește concentrația de etilcetone, se formează derivații acidului propanoic și alți compuși caracteristici fermentației, diene, metil ester, dar și noi derivați ai pirolului.



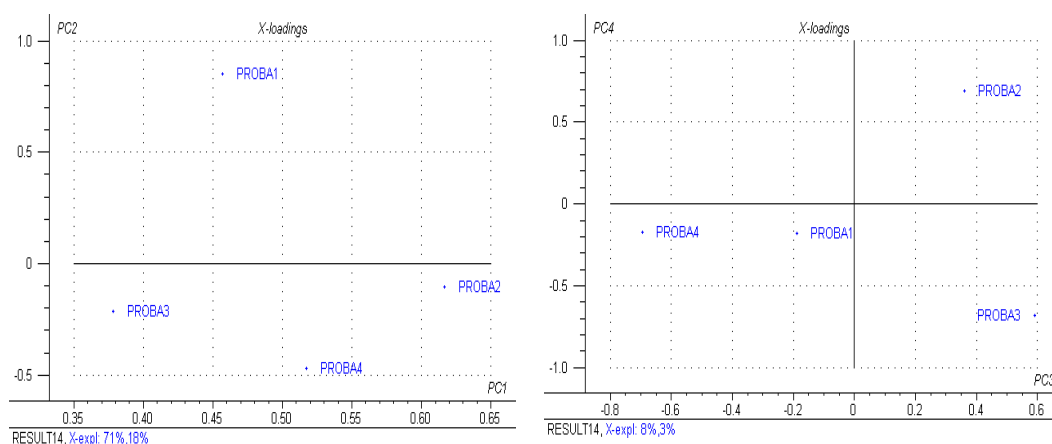


Figura 7.36. Gruparea de tip cluster a compușilor pentru probele de Sana și influența componentelor principale în a șaptea zi de depozitare

Analiza componentului principal la șapte zile arată ca probele sunt grupate diferit față de prima zi. Astfel proba 4 și proba 1 sunt influențate semnificativ de componentul principal PC1, dar sunt în sectoare diferite și acest lucru le diferențiază puternic. Probele 2 și 3 sunt influențate de componentele principale PC2 și PC4. Componentele principale PC3 și PC 4 explică mai puțin din variația totală, doar 11% față de componentele principale PC1 și PC2 care explică 81% din variația totală. În proba 4 se disting compușii cu sulf ($C_{23}H_{24}O_5S$ și $C_{17}H_{10}ClN_3O_2S$) cu un rol important, iar în proba 1 cei cu oxigen.

Probele 2 și 3 se situează în cadrane diferite în funcție de componentele principale PC3 și PC 4. Aceeași etil cetonă observată în prima zi de depozitare apare și la șapte zile în toate probele, mai puțin în proba 3.

Analiza componentului principal plasează din nou proba 2 într-o poziție avansată față de celelalte probe pentru toate cele patru componente considerate.

7.3.4. Concluzii parțiale

- În urma analizei nivelului de proteoliză s-a remarcat ca aceasta este diferită în cele 4 probe de produse noi fabricate industrial.
- În cazul bacteriilor lactice, fără adaos de probiotice, se observă pe întreaga durată de depozitare o activitate proteolitică redusă.
- Rezultatele experimentale demonstrează că adăugarea de bacterii probiotice crește nivelul proteolizei.
- Adaosul de tulpini probiotice, datorita activității lor proteolitice, a determinat creșterea numărului de grupări aminice libere.
- Nivelul crescut al proteolizei sugerează o rată de supraviețuire mai bună a microorganismelor, în special a tulpinilor probiotice, ceea ce și dorim.
- S-a decis consumul acestor produse după o perioadă mai scurtă (7 zile) pentru a nu apărea modificări semnificative ale gustului. De asemenea, încărcătura microbiană mare rezultată din nivelul ridicat de inoculare față de produsele clasice duce la o limitare a termenului de valabilitate.
- Degustarea s-a realizat în a șaptea zi de păstrare a produsului lactat fermentat. Pentru degustătorii peste 35 ani, punctajul maxim a fost obținut de proba 2, urmată de proba 4, pe

ultimele doua locuri situându-se probele 3 și 1. Grupa de paneliști cu vârsta sub 35 de ani nu a sesizat diferențe prea mari între probe. Și în acest caz, proba 2 este influențată cel mai mult de componentul principal PC1, care explică 97% din variația totală. Proba 4 este foarte apropiată de proba 2 în preferințele consumatorilor sub 35 de ani, ca și în cele ale celor peste 35 de ani. Prin urmare cele două grupe de consumatori au apreciat că proba 2 (lapte + făină de hrișcă 5% + Flora Danica + La-5®) se află în fruntea preferințelor, iar aceasta este urmată foarte îndeaproape de proba 4 (lapte + făina de hrișcă 5% + Flora Danica + La-5® + *L.casei*-431®)

- În profilul de aromă al probelor 1, 2, 3 și 4 după prima zi de fermentare există diferențe care pot fi puse în evidență cu ajutorul analizei GC/MS și prin interpretare statistică multivariată a rezultatelor obținute.
- După șapte zile de depozitare profilul compușilor de aromă se modifică semnificativ. În cazul probei 1 crește concentrația de etilcetone, se formează derivați ai acidului propanoic și alți compuși caracteristici fermentației (diene, metil ester, dar și derivați ai pirolului).
- Totalul compușilor volatili cu azot și sulf prezenți în analiza GC/MS SPME indică o proteoliză mai intensă în proba 4, în concordanță cu testele biochimice și analizele microbiologice.
- Cu toate că nu au putut fi identificați compușii specifici simpli de aromă pentru produsele fermentate, ci derivați ai acestora datorită reacțiilor chimice care au avut loc, mapearea spectrului de aromă a pus în evidență o serie de diferențe între probe și compuși specifici care au putut fi asociați cu intensitatea și natura proceselor fermentative.
- Este importantă corelația rezultatelor obținute pentru proba 2 din punctul de vedere al preferințelor degustătorilor și al profilului de aromă determinat instrumental, ceea ce califică acest produs ca și un bun candidat pentru lansarea pe piață.

8. CONCLUZII FINALE

Studiile incluse în teza de doctorat intitulată *Cercetări privind supraviețuirea în condiții de simbioză a unor tulpini de bacterii probiotice în produsele lactate fermentate* contribuie la o mai bună cunoaștere a supraviețuirii și stabilității unor culturi probiotice în produsele lactate fermentate în condiții mezofile, în prezența adaosurilor de produse prebiotice. Cunoașterea dinamicii și comportamentului culturilor probiotice pe durata fermentării și a depozitării produselor la temperatura de 4°C, timp de 21 de zile, permite procesatorilor din industria laptelui să diversifice gama de produse lactate probiotice cu proprietăți nutritive și funcționale îmbunătățite, utilizând ca vector produsele lactate mezofile, foarte populare în anumite țări, precum: România, țările scandinave, Rusia și Ucraina.

Pe baza concluziilor parțiale prezentate la finalul fiecărui capitol din cadrul studiului experimental, în sumarul de mai jos sunt evidențiate concluziile generale ale studiului:

- Culturile starter probiotice studiate, *Lactobacillus acidophilus* LA-5®, *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* *L. casei*-431® și *Bifidobacterium bifidus* BB-12® sunt culturi comerciale produse de compania daneză Chr. Hansen, pentru care există studii tehnologice și clinice și o descriere detaliată a proprietăților și a comportamentului biotehnologic. Cele trei culturi probiotice au fost utilizate în culturi multiple împreună cu cultura mezofilă Flora Danica, în vederea obținerii de produse lactate tip Sana. S-a urmărit comportamentul biotehnologic și

menținerea viabilității bacteriilor probiotice în condiții de refrigerare pe perioada termenului de valabilitate (21 de zile).

- Multiplicarea și stabilitatea tulpinilor probiotice utilizate în culturi multiple cu cultura mezofilă Flora Danica variază în funcție de tulpină și de combinațiile utilizate, însă cea mai bună combinație, în care s-a înregistrat un comportament considerat adecvat din punctul de vedere al calității și al asigurării caracterului funcțional al produselor fermentate, este FD+LA+LC în care culturile sunt inoculate în proporții egale (o concentrație de celule în inocul de 9 ufc/mL pentru fiecare cultură).
- În ceea ce privește menținerea viabilității bacteriilor probiotice în timpul celor 21 de zile de păstrare la temperatura de 4°C, cel mai mare grad de supraviețuire de 8 log ufc/mL și respectiv de 9 log ufc/mL l-au prezentat culturile: a) *L. casei* 431® în combinația FD+LC+BB și b) LA-5® în combinația FD+LA+LC.
- Având în vedere comportamentul biotehnologic și gradul de supraviețuire în produsul finit, culturile probiotice LA-5® și *L. casei* 431® au fost selectate pentru optimizarea condițiilor biotehnologice de obținere a produselor lactate probiotice (tip Sana) în culturi starter multiple cu cultura Flora Danica.
- S-a demonstrat că principalii factori care influențează viabilitatea celulelor culturilor probiotice analizate în culturi multiple sunt: temperatura de fermentare, raportul cultură probiotică:cultură mezofilă (Flora Danica) și concentrația de făină de hrișcă, adăugată cu rol prebiotic. Aceste concluzii au fost reliefate prin utilizarea metodelor de modelare matematică și analiză statistică, folosind metoda Plackett-Burman și metoda analizei suprafeței de răspuns. Modele matematice identificate descriu fidelitatea proceselor practice, rezultatele fiind confirmate prin validare.
- În vederea obținerii unui produs de tip Sana cu culturi probiotice și adaos de prebiotice în care să se asigure o concentrație standardizată de celule viabile de 9 log ufc/mL, în cazul culturii LA-5®, după 7 zile de păstrare la temperatura de 4°C trebuie să se respecte următoarele condiții biotehnologice: să se adauge în lapte 5% (m/v) făină de hrișcă, un inocul format dintr-un raport optim cultura probiotică:cultură mezofilă Flora Danica cuprins între 1,46 – 1,56, și o temperatură de fermentare cuprinsă între 35,5...42°C.
- În cazul culturii *L. casei*-431®, o concentrație de celule viabile de 8,8 log ufc/mL după 7 zile de păstrare la temperatura de 4°C se obține dacă se respectă următoarele condiții fermentative: un adaos de 5% (m/v) făină de hrișcă în lapte, un raport cultură probiotică:cultură mezofilă Flora Danica cuprins între 1,48 – 2,0 și o temperatură de fermentare cuprinsă între 37...42°C.
- Pentru produsele în care se utilizează ambele culturi starter probiotice, pentru a asigura concentrația standard de celule viabile în produsul finit pe toată perioada termenului de valabilitate, se recomandă respectarea următoarelor condiții biotehnologice: temperatura de fermentare 37°C, un adaos de 5% (m/v) făină de hrișcă și un raport de culturi probiotice:cultură mezofilă Flora Danica de 2,0.
- Au fost obținute în condiții industriale la S.C. Almera International SRL Bacău produsele probiotice tip Sana noi formulate și s-au evaluat calitatea microbiologică, analiza

compozițională și viabilitatea culturilor probiotice LA-5® și *L. casei* 431®. Culturile probiotice și cultura mezofilă Flora Danica au prezentat un comportament diferit în multiplicare și creștere în perioada de fermentare și o evoluție diferită în ceea ce privește gradul de supraviețuire la depozitare prin refrigerare în produsele fermentate, comparativ cu cazul în care fermentațiile au fost conduse la nivel de laborator.

- S-a demonstrat că tulpina *L. casei* - 431® prezintă o rezistență superioară în condițiile fermentative testate în toate combinațiile de culturi starter utilizate, ceea ce o recomandă pentru obținerea de produse probiotice tip Sana, în care și adaosul de 5% făină de hrișcă are un rol important.
- Prin tehnica de analiză spectrală FTIR s-a caracterizat profilul compozițional al grupărilor funcționale din structura moleculelor compușilor bioactivi din produsele lactate obținute la nivel industrial. S-a demonstrat existența unor diferențe clare de compoziție a produselor fermentate, corelată cu tipul și combinația de culturi starter utilizate. Din analiza spectrelor obținute se certifică prezența compușilor bioactivi cu rol funcțional din compoziția produselor fermentate analizate, care își păstrează stabilitatea biochimică și microbiologică în timpul conservării pe toată perioada termenului de valabilitate.
- Evaluarea transformărilor biochimice în produsele lactate funcționale fermentate obținute la nivel industrial cu culturi probiotice multiple și adaos de făină de hrișcă demonstrează că utilizarea culturilor probiotice intensifică procesul de proteoliză cu creșterea numărului de grupări aminice libere, ceea ce asigură un grad de supraviețuire superior al bacteriilor probiotice.
- Pentru a nu apărea modificări semnificative ale gustului datorită nivelului ridicat de inoculare (încărcătură microbiană mare) față de produsele clasice și a adaosului de făină de hrișcă s-a decis pentru această etapă a studiului limitarea termenului de valabilitate al produselor obținute industrial la 7 zile.
- Analiza profilului compușilor de aromă în produsele obținute industrial a demonstrat că există diferențe de compoziție în funcție de varianta de fermentare pentru care se optează, care au fost puse în evidență cu ajutorul analizei GC-MS și prin interpretare statistică multivariată a rezultatelor obținute. Profilul compușilor de aromă se modifică semnificativ în timpul păstrării produselor. Prezența în concentrații ridicate a compușilor volatili cu azot și sulf indică o proteoliză mai intensă în produsul obținut cu combinația de culturi FD+LA+LC, în corelație și cu testele biochimice și analizele microbiologice realizate.
- În ceea ce privește analiza senzorială a produselor noi obținute industrial, panelul de degustători a apreciat în primul rând produsul în care s-a utilizat cultura La-5® în combinație cu Flora Danica și apoi produsul obținut cu combinația de culturi La-5® + *L. casei* 431® și Flora Danica, în ambele cazuri adăugându-se în mediul de fermentare și 5% făină de hrișcă.

În final, putem concluziona că tulpinile probiotice comercializate de compania Chr. Hansen, LA-5® și *L. casei* -431®, utilizate sub formă de culturi DVS, au capacitatea de a coopera și de a supraviețui în culturi multiple. În produsele lactate fermentate mezofile tip Sana, în care laptele se suplimentează cu 5% făină de hrișcă, metabolismul culturilor starter probiotice este mult

îmbunătățit. Totodată, acceptabilitatea demonstrată a consumatorilor față de aceste produse crează toate premisele lansării pe piață de noi produse lactate funcționale.

9. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective

Alimentele funcționale, în special cele cu efecte asupra sănătății gastro-intestinale și a imunității, cum sunt cele probiotice, prezintă un potențial imens și se găsesc în topul temelor și proiectelor de cercetare dezvoltate la nivel mondial. Dezvoltarea fără precedent a producerii alimentelor funcționale reprezintă un răspuns la tendințele globale de consum și a fost posibilă ca urmare a volumului mare de date acumulate din cercetarea științifică, care au dovedit importanța unor compuşii în promovarea și menținerea sănătății.

Cunoașterea comportamentului culturilor starter probiotice, pe durata fermentării și a depozitării produselor la temperatura 4°C, timp de 21 de zile, poate sprijini producătorii din industria laptelui în dezvoltarea de produse lactate probiotice noi, utilizând ca vector produsele lactate fermentate mezofile, care se găsesc în topul preferințelor de consum ale românilor, dar și ale consumatorilor din țările scandinave, Rusia, Ucraina.

- Teza de doctorat intitulată *Cercetări privind supraviețuirea în condiții de simbioză a unor tulpini de bacterii probiotice în produsele lactate fermentate* oferă o serie de date cu valoare fundamentală și aplicativă ce contribuie la diversificarea gamei de produse funcționale printr-o mai bună cunoaștere a comportamentului biotehnologic și a stabilității și supraviețuirii unor culturi probiotice (produse și comercializate de compania Christian Hansen) în produsele lactate fermentate în condiții favorabile bacteriilor mezofile, în prezența adaosurilor de produse prebiotice. Studiul este considerat interesant și de compania Chr. Hansen, care este lider mondial în producția de culturi și de bacterii probiotice. Compania are o experiență de peste 100 ani în dezvoltarea de culturi lactice și de peste 40 în utilizarea bacteriilor probiotice în aplicația iaurt, dar o experiență extrem de limitată în ceea ce privește utilizarea bacteriilor probiotice în produse lactate fermentate mezofile. Compania Chr. Hansen a furnizat culturile Flora Danica și a susținut o parte din cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat.

Contribuțiile originale ale tezei de doctorat pot fi sintetizate după cum urmează:

- S-a studiat comportamentul biotehnologic, stabilitatea și supraviețuirea unor tulpini probiotice foarte bine documentate clinic, respectiv *Lactobacillus acidophilus* (LA-5®), *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* (*L. casei* -431®), *Bifidobacterium bifidus* (BB-12®), folosind un vector alimentar nou, reprezentat de produsele lactate fermentate mezofile, cu adaos făina de hrișcă, element de noutate pentru România. Rezultatele deschid noi oportunități de diversificare a produselor lactate funcționale cu bacterii probiotice fermentate cu culturi starter mezofile multiple.
- S-a dovedit extrem de utilă valorificarea făinii de hrișcă cu efecte benefice asupra metabolismului bacteriilor lactice și desigur cu impact deosebit asupra sănătății consumatorilor. Odată cu "revoluția naturistă", hrișca a revenit în prim-planul producătorilor de alimente, dar și al cercetătorilor în domeniul medical, fiind practic redescoperită ca aliment-medicament. Exista un număr foarte restrâns de studii referitoare

la rolul ei de a potența activitatea bacteriilor probiotice din alimente. Sunt evidențiate în teza de doctorat și oportunitățile de valorificare a potențialului ridicat pe care îl are hrișca pentru utilizare în alimentație.

- S-a demonstrat posibilitatea obținerii la nivel industrial a produselor fermentate nou formulate și s-au stabilit condițiile biotehnologice optime pentru obținerea produselor de calitate, cu asigurarea rolului funcțional, demonstrat pe baza caracterizării fizico-chimice și microbiologice, utilizând metode moderne de investigare, modelare matematică și analiză statistică.

Rezultatele obținute asigură premise noi pentru dezvoltarea în România a producției de produse probiotice de calitate, cu impact deosebit asupra diversificării gamei de produse alimentare sănătoase și creșterii calității vieții.

10. Diseminarea rezultatelor cercetărilor

Rezultatele cercetărilor desfășurate în cadrul tezei de doctorat au fost prezentate pentru diseminare în patru articole reprezentative pentru domeniul abordat (unul în revista citată ISI și trei în reviste indexate în baze de date internaționale). Unele rezultate au fost comunicate la două manifestări internaționale organizate la Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați (Simpozionul internațional Euro-aliment, octombrie 2011, Galați – lucrarea “Study of physiological properties of some properties of some probiotics in multiple cultures with mesophilic lactic acid bacteria”) și la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca (Simpozionul internațional “Perspective ale Agriculturii Mileniului III”, septembrie 2012 – lucrarea “Evaluation of Some Factors with Significant Influence on Functionality and Viability of Probiotic Strains LA-5® and L. Casei 431® in Multiple Starter Cultures in Mesophilic Fermented Milk”).

A. Publicație în revista cotată ISI

1. Aida Vasile, Tudor Lucian Miron, Daniela Paraschiv, Gabriela Bahrim, Stefan Dima, 2011, The enhancement of the growth ability and the viability of some probiotic bacteria in media with wild *Origanum vulgare* L. extract, publicat în Romanian Biotechnological Letters, Vol. 16, No. 6

B. Publicații în reviste indexate în baze de date internaționale

1. Aida Vasile, Daniela Paraschiv, Stefan Dima, Gabriela Bahrim, Growth and cell viability improve of the probiotic strain *Lactobacillus casei ssp. Paracasei* in the presence of oat bran and buckwheat flour, 2011, Innovative Romanian Food Biotechnology (2011) 9, 52-59

2. Daniela Paraschiv, Aida Vasile, Madalina Constantin, Alexandru Ciobanu, Gabriela Bahrim, Study of physiological properties of some probiotics in multiple cultures with mesophilic lactic acid bacteria by Flora Danica Chr. Hansen commercial starter, 2011 The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI – Food Technology 35(2) 56-65.

3. Daniela Paraschiv, Aida Vasile, Gabriela Bahrim, Evaluation of Some Factors with Significant Influence on Functionality and Viability of Probiotic Strains LA-5® and L. Casei 431® in Multiple Starter Cultures in Mesophilic Fermented Milk, 2012, Bulletin UASVM Agriculture, 69(2)/2012.