



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OIPOSDRU



UNIVERSITAS
GALATIENSIS

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de *Inginerie*



CERCETĂRI BIOTEHNOLOGICE DE OBȚINERE A UNUI ALIMENT FUNCȚIONAL PE BAZĂ DE PSEUDOCEREALE

(REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT)

Conducător de doctorat,
Prof univ.dr.ing. **Camelia VIZIREANU**

Doctorand
Ing. Caterina Nela BRAJDEȘ (DUMITRU)

Seria I 1: Biotehnologii Nr 1

GALAȚI

2013



ROMÂNIA
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE

C 7959/15.10.2013

C ă t r e

Universitatea “Dunărea de Jos “ din Galați vă face cunoscut că, în data de _____ ora __ ,
în _____ , va avea loc susținerea
publică a tezei de doctorat intitulată: „CERCETĂRI BIOTEHNOLOGICE DE OBȚINERE A UNUI
ALIMENT FUNCȚIONAL PE BAZĂ DE PSEUDOCEREALE”, elaborată de doamna/domnul **BRAJDEȘ
CATERINA-NELA (DUMITRU)**, în vederea conferirii titlului științific de doctor în domeniul de doctorat
Biotehnologii.

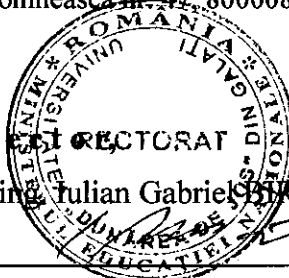
Comisia de doctorat are următoarea componență :

- | | |
|----------------------------------|--|
| 1. Președinte | Prof.univ.dr.ing. Petru ALEXE
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați |
| 2. Conducător de doctorat | Prof.univ.dr.ing. Camelia VIZIREANU
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați |
| 3. Referent oficial | Prof.univ.dr.habilitat Rodica STURZA
Universitatea Tehnică a Moldovei Chișinău,
Rep. Moldova |
| 4. Referent oficial | Prof.univ.dr. Carmen SOCACIU
Universitatea de Științe Agricole și Medicină
Veterinară Cluj-Napoca |
| 5. Referent oficial | Prof.univ.dr.ing. Gabriela BAHRIM
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați |

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

RECTORAT

Prof. univ. dr. ing. **Tulian Gabriel BARSAN**



CUPRINS

ARGUMENT.....	13
I. STUDIUL DOCUMENTAR	
1. Stadiul actual și de perspectivă în folosirea alimentelor funcționale.....	18
1.1. Alimente funcționale.....	18
1.2. Probioticele.....	19
1.3. Prebioticele.....	22
1.4. Compușii antioxidanți.....	23
1.4.1. Flavonoidele.....	23
1.4.2. Non-flavonoidele.....	28
1.4.3. Mecanismul de acțiune.....	28
1.5. Pseudocerealele.....	29
1.5.1. Hrișca (<i>Fagopyrum esculentum</i> MOENCH).....	30
1.5.1.1. Compoziția chimică.....	34
1.6. Perspective de viitor al alimentelor funcționale.....	36
II. CERCETĂRI PROPRII	
2. Materiale și metode de investigare utilizate în cercetare.....	38
2.1. Materiale.....	38
2.2. Metode de analiză.....	38
2.2.1. Analize fizico-chimice și biochimice.....	38
2.2.1.1. Conținutul de umiditate, respectiv substanța uscată (s.u.).....	38
2.2.1.2. Determinarea conținutului de cenușă.....	39
2.2.1.3. Determinarea azotului total.....	39
2.2.1.4. Determinarea conținutului de grăsime.....	39
2.2.1.5. Determinarea glucidelor reducătoare.....	39
2.2.1.6. Determinarea conținutului de amidon.....	40
2.2.1.7. Determinările conținuturilor de fibre totale și fibre insolubile	40
2.2.1.8. Determinarea pH-ului.....	42
2.2.1.9. Determinarea acidității totale.....	42
2.2.1.10. Analiza conținutului total de polifenoli.....	42

2.2.1.11. Estimarea conținutului total de flavonoide.....	43
2.2.1.12. Determinarea activității antioxidante prin metoda cu DPPH.....	44
2.2.1.13. Analiza HPLC a aminoacizilor.....	44
2.2.1.14. Analiza HPLC a compușilor fenolici.....	45
2.2.1.15. Analiza FTIR.....	47
2.2.1.16. Determinarea profilului mineral.....	47
2.2.1.17. Determinarea compoziției corporale.....	48
2.2.1.18. Determinarea profilului lipidic.....	48
2.2.1.19. Metoda simulării, <i>in vitro</i> , a condițiilor gastrointestinale.....	48
2.2.2. Analize imunochimice.....	49
2.2.2.1. Determinarea glutenului.....	49
2.2.3. Analize microbiologice.....	50
2.2.3.1. Determinarea numărului total de bacterii lactice.....	50
2.2.3.2. Determinarea drojdiilor și mucegaiurilor.....	50
2.2.3.3. Determinarea bacteriilor coliforme și a enterobacteriilor.....	51
2.2.4. Metodele de analiză statistică și modelare.....	51
2.2.4.1. Analiza statistică.....	51
2.2.4.2. Metodologia suprafeței de răspuns (MRS) și Designul Box- Behnken.....	51
2.2.4.3. PCA (Analiza componentelor principale).....	52
2.2.4.4. Software-ul CurveExpert Professional 2.0.0.....	52
3. Influența procesului de germinare asupra compușilor bioactivi din hrișcă.....	53
3.1. Introducere.....	53
3.2. Compoziția chimică.....	55
3.2.1. Evoluția substanței uscate în timpul germinării.....	56
3.2.2. Influența germinării asupra conținutului de cenușă.....	57
3.2.3. Evoluția conținutului de substanțe minerale.....	58
3.2.4. Evoluția conținutului de proteine.....	60
3.2.5. Evoluția glucidelor în timpul germinării.....	63
3.2.6. Evoluția conținutului de lipide.....	65
3.2.7. Prezența glutenului.....	66
3.2.8. Evoluția conținutului de antioxidanți.....	66
3.3. Concluzii parțiale.....	76

4. Optimizarea procesului de fermentare cu bacterii probiotice a extractului de hrișcă germinată.....	78
4.1. Introducere.....	78
4.2. Analiza statistică.....	81
4.3. Optimizarea concentrației de polifenoli.....	84
4.4. Optimizarea concentrației de flavonoide.....	89
4.5. Optimizarea capacității antioxidante.....	92
4.6. Optimizarea numărului de celule probiotice (log ufc/mL).....	94
4.7. Optimizarea integrată după terminarea fermentației.....	96
4.8. Optimizarea globală.....	102
4.9. Analiza componentelor principale.....	108
4.10. Concluzii parțiale.....	113
5. Analiza fizico-chimică și microbiologică a produsului sinbiotic pe bază de hrișcă germinată.....	115
5.1. Introducere.....	115
5.2. Compoziția chimică.....	116
5.3. Identificarea prezenței glutenului.....	119
5.4. Procesul de fermentație.....	120
5.5. Variația compușilor fenolici și a activității antioxidante în timpul fermentării și a depozitării.....	127
5.1.1. Analiza compușilor fenolici prin HPLC.....	129
5.5.2. Analiza FTIR.....	133
5.6. Influența condițiilor gastrointestinale asupra viabilității culturii de <i>Lactobacillus plantarum</i>	136
5.7. Evoluția compușilor fenolici în sistem de simulare a condițiilor gastrointestinale, <i>in vitro</i>	138
5.8. Concluzii parțiale.....	145
6. Impactul băuturii asupra parametrilor sangvini și antropometrici	146
6.1. Introducere.....	146
6.2. Pregătirea studiului.....	153
6.3. Rezultate și discuții.....	153
6.3.1. Indicele de masă corporală (IMC).....	155
6.3.2. Masa musculară.....	155
6.3.3. Masa de grăsime.....	156
6.3.4. Țesut adipos visceral.....	157

6.3.5. Variația colesterolului în perioada testării.....	157
6.3.6. Variația trigliceridelor în perioada testării.....	158
6.3.7. Variația HDL în perioada testării.....	159
6.3.8. Variația nonHDL colesterolului în perioada testării.....	159
6.3.9. Variația LDL-colesterolului în perioada testării.....	160
6.3.10. Variația indicelui aterogenic în perioada testării.....	161
6.4. Discuții.....	161
6.4.1. Influența probioticelor asupra variației parametrilor sangvini.....	161
6.4.2. Influența inulinei în modificarea parametrilor sangvini.....	162
6.4.3. Efectele antioxidanților asupra modificării parametrilor sangvini.....	163
6.5. Concluzii parțiale.....	167
7. Concluzii generale și perspective.....	168
7.1. Concluzii generale.....	168
7.2. Perspective.....	169
Diseminarea rezultatelor cercetării.....	170
Referințe bibliografice.....	172

ARGUMENT

În 2010, OMS a prezis că până în 2030, bolile cardiovasculare, care afectează în prezent peste 23 milioane de oameni, vor rămâne principalele cauze de deces. Riscul de infarct de miocard este de trei ori mai mare la persoanele cu hipercolesterolemie, comparativ cu persoanele care prezintă profiluri lipidice normale. În afara instituirii unui regim alimentar hipocolesterolemiat, s-au încercat și alte abordări, de exemplu suplimentarea dietei cu alimente funcționale, cu rol de scădere a colesterolului.

Domeniul alimentelor funcționale reprezintă un domeniu de cercetare foarte vast, care îmbină studiile de genomică, epidemiologie și clinice cu progresele din industria alimentară, în concordanță cu cerințele și preferințele consumatorilor.

Alimentele funcționale sunt produse alimentare precum și componente ale acestora, care în afara faptului că satisfac foamea și asigură necesarul nutrițional, aduc beneficii organismului, prin creșterea imunității și ameliorarea sau rezolvarea anumitor afecțiuni. În ultimii ani se observă că atât aderența cât și complianța la acest trend este în creștere. Conștientizarea beneficiilor alimentelor funcționale asupra sănătății poate să conducă, în timp, la o scădere a adresabilității populației pentru asistența medicală.

Atenția nutriționiștilor se îndreaptă tot mai mult asupra unor alimente valoroase, ușor de găsit, iar semințele de hrișcă germinate reprezintă una dintre cele mai concentrate surse (complet naturale) de vitamine, minerale, enzime, proteine și antioxidanți naturali.

Obiectivul acestui studiu îl reprezintă realizarea, prin procesul de germinare și optimizare a fermentației, a unui aliment funcțional pe bază de pseudocereale, și anume hrișca, cu potențiale efecte benefice în dislipidemie, supraponderabilitate/obezitate, boli cardiovasculare și hepatice, diabet, celiachie, precum și folosirea ei în alimentația copiilor și sportivilor

Prin compoziția chimică, hrișca comună reprezintă un aliment funcțional deosebit de eficient. Hrișca este singura plantă de câmp și una dintre puținele plante care prezintă un compus biologic activ, rutinul, cu acțiune deosebit de puternică în bolile cardiovasculare. Principala proprietate a rutinului este de a scădea permeabilitatea capilară și implicit fragilitatea capilară, îmbunătățind hemodinamica sistemului capilar și, de asemenea, este un antioxidant deosebit de

eficient. Diverse studii au arătat că flavonoidele prezente în hrișcă exercită efecte benefice asupra tuturor metabolismelor din organismul uman.

Prin germinare combinată cu fermentare, valoarea biologică și funcțională a hrișcăi crește. Conținutul în antioxidanți crește foarte mult, astfel încât valoarea funcțională a alimentului obținut este foarte ridicată.

Combinarea acestor resurse vegetale valoroase, care prin compoziția chimică pot fi considerate prebiotice bogate în antioxidanți, cu probiotice reprezintă un element de noutate în categoria alimentelor funcționale.

Produsul sinbiotic realizat va fi o băutură fermentată cu probiotice care va fi testat pe consumatori și urmărite efectele apărute în urma consumului acestui aliment.

Principalele obiective ale studiului de față sunt:

1. *Caracterizarea semințelor de hrișcă și urmărirea modificărilor biochimice ale semințelor de hrișcă pe parcursul a șapte zile de germinare.*
2. *Optimizarea procesului de fermentație pentru identificarea variantei de băutură funcțională cu conținut maxim de antioxidanți și probiotice atât după terminarea fermentației, cât și pe întreaga perioadă de valabilitate a produsului.*
3. *Analiza fizico-chimică și microbiologică a produsului funcțional obținut.*
4. *Impactul băuturii funcționale asupra compoziției corporale și a profilului lipidic a unor voluntari.*

STRUCTURA TEZEI

Teza este structurată în două părți principale, prima parte incluzând studiul de literatură, iar cea de-a doua parte, contribuții personale, rezultate, discuții și concluzii.

Lucrarea conține 198 de pagini, 100 de figuri, 31 de tabele, o schemă tehnologică și 322 de referințe bibliografice.

PARTEA ÎNTÂI: STUDIUL DE LITERATURĂ, cuprinde **Capitolul 1**, intitulat **Stadiul actual și de perspectivă în folosirea alimentelor funcționale**

PARTEA A DOUA: CERCETĂRI PROPRII, cuprinde șase capitole, fiecare dintre acestea urmărind: motivație și obiective, rezultate, discuții, concluzii parțiale.

Capitolul 2. Materiale și metode cuprinde enumerarea materialelor precum și o descriere a metodelor, modelelor și modelărilor matematice folosite în studiu.

Capitolul 3. Caracterizarea procesului de germinare cuprinde caracterizarea chimică a semințelor de hrișcă și a semințelor de hrișcă germinată pe parcursul a șapte zile.

Capitolul 4. Optimizarea procesului de fermentație cuprinde optimizarea parametrilor biotehnologici pentru obținerea băuturii funcționale, precum și evoluția compușilor antioxidanți și a celulelor probiotice pe parcursul perioadei de conservare, de 21 de zile.

Capitolul 5. Analiza fizico-chimică și microbiologică a băuturii funcționale cuprinde caracterizarea băuturii funcționale.

Capitolul 6. Impactul băuturii funcționale asupra unor parametri ai compoziției corporale și ai profilului lipidic sangvin cuprinde o analiză a modificărilor sangvine a zece respondenți care au loc pe parcursul a cinci săptămâni.

Partea de cercetări proprii se încheie cu **Capitolul 7. Concluzii generale și perspective** ale studiului. În continuare sunt prezentate diseminarea rezultatelor și bibliografia aferentă studiilor efectuate.

Studiul a fost efectuat în cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Departamentul de Biochimie, laboratorul de Microbiologie, Platforma BIOALIMENT și laboratorul de Chimie, Fizică și Mediu al Facultății de Științe și Mediu din cadrul Universității „Dunărea de Jos” din Galați.

Elementele de originalitate ale tezei sunt:

- ❖ *Primul studiu din România care propune o modalitate de valorificare a potențialului bioactiv al hrișcăi, precum și caracterizarea sa.*
- ❖ *Obținerea unei băuturi funcționale unice, care reunește atât componente probiotice, cât și componente prebiotice bogate în compuși antioxidanți*
- ❖ *Evidențierea atât a celulelor probiotice viabile, cât și a compușilor antioxidanți după simularea gastrointestinală, in vitro, prin analize microbiologice, HPLC și spectroscopie în infraroșu.*
- ❖ *Verificarea efectelor benefice ale băuturii funcționale prin analiza compoziției corporale și a profilului lipidic sangvin a zece respondenți, după consumul băuturii funcționale.*

Capitolul 1.

STADIUL ACTUAL ȘI DE PERSPECTIVĂ ÎN FOLOSIREA ALIMENTELOR FUNCȚIONALE

1.1. Alimente funcționale

Principiul "*Alimentul să vă fie medicament și medicamentul aliment*" ales de către Hipocrate cu 2500 ani în urmă prezintă un interes reînnoit datorită evoluției științifice și tehnice a ultimilor ani care și-a pus amprenta asupra modului de viață al oamenilor.

Termenul de alimente funcționale, așa cum se aplică la produsele alimentare, a adoptat noi valențe: acelea de a oferi, în afara satisfacerii nevoilor nutritive de bază, avantaje suplimentare fiziologice, care contribuie la menținerea stării optime de sănătate fizică, psihică și mentală a populației.

European Commission's Concerted Action on Functional Food Science in Europe (FUFOSE) a definit alimentele funcționale astfel: "*Un nutrient poate fi cu ușurință considerat doar aliment funcțional dacă s-a dovedit în mod satisfăcător, că se pot schimba în mod pozitiv una sau mai multe funcții de țintă, pe lângă efectele nutritive, pentru a îmbunătăți în mod constant starea de sănătate, bunăstare în timp ce este redus riscul de orice afecțiune. Un aliment funcțional ar trebui să fie în mod ideal, un nutrient și nu ar trebui să se schimbe eficacitatea acestuia atunci când intră într-un regim alimentar, acesta nu ar trebui să fie pastilă sau capsulă.*" <http://www.ilsa.org/Europe/Pages/FUFOSE.aspx> (Scientific Concepts of Functional Foods in Europe). Aceași comisie a concluzionat că, practic, un aliment funcțional poate fi:

- un aliment natural;
- un produs alimentar la care s-a adăugat un component;
- un aliment care nu mai deține un component;
- un produs alimentar în care unul sau mai multe componente au fost schimbate;
- un produs alimentar în care biodisponibilitatea unuia sau mai multor componente au fost modificate;
- oricare combinație a caracteristicilor anterioare.

Celiachia, diabetul de tip 2, obezitatea, sindromul metabolic sunt afecțiuni cronice cu o mare incidență în rândul populației, pentru care tratamentul igienico-dietetic este primordial. În acest sens, extinderea gamei de produse funcționale pentru aceste categorii de persoane este benefică.

De exemplu, pot fi considerate alimente funcționale alimentele care conțin probiotice și/sau prebiotice și/sau antioxidanți.

Perspectivă de viitor al alimentelor funcționale

Rolul alimentelor funcționale atât în prevenția, cât și în reducerea sau ameliorarea simptomelor cauzate de diverse afecțiuni este susținut de rezultatele diverselor studii clinice. Înțelegerea efectelor ingredientelor alimentelor asupra sănătății oamenilor va determina pe termen lung o schimbare a modului de hrănire și implicit o scădere a riscului de morbiditate și mortalitate datorate în special obezității și bolilor cardiovasculare.

Aceste afecțiuni, împreună cu toate consecințele ce urmează, apar odată cu atitudinea pe care consumatorul o alege în fața “farfuriei”.

Bolile cronice, datorate stilului de viață sedentar și abundenței de alimente foarte procesate, nu sunt rezolvate cu consumul de medicamente. În acest sens, o creștere tot mai mare a colaborării dintre nutriționiști și cercetătorii și producătorii din industria alimentară va conduce la identificarea acelor surse de hrană cu potențial benefic maxim asupra sănătății oamenilor. De asemenea, prin continuarea studiilor de monitorizare a sănătății publice după consumul de alimente funcționale, se vor înțelege și alte aspecte neelucidate până în prezent.

Extinderea gamei, împreună cu mediatizarea rolului pe care îl au alimentele funcționale ar conduce la alegeri mai ușoare din partea consumatorilor. Este posibil ca aceste alimente funcționale să prezinte un preț mai mare decât alimentele „fast-food”, dar, având în vedere balanța risc/beneficiu pentru sănătate, se poate spune cu ușurință care va fi alegerea.

Existența unor strategii la nivel național privind activitatea de cercetare a alimentelor funcționale, precum și testarea eficienței acestora, vor conduce la dezvoltarea acestui segment de piață. Existența unor studii clinice care să dovedească eficiența alimentelor funcționale vor convinge consumatorul privind alegerile.

CAPITOLUL 2

MATERIALE ȘI METODE DE INVESTIGARE UTILIZATE ÎN CERCETARE

În cadrul acestui subcapitol sunt prezentate materialele, caracteristicile generale ale acestora și metodele de analiză utilizate pentru rezolvarea obiectivelor programului de cercetare doctoral.

2.1. Materiale

Materia primă, utilizată în cadrul programului de cercetare doctoral, a fost reprezentată de hrișca recoltată în anii 2010, 2011, 2012. A fost achiziționată din Republica Moldova.

În cadrul cercetării au fost folosite și alte materiale: mierea de hrișcă achiziționată de la Smitty Bee Honey Inc. Company din Iowa, USA; inulina achiziționată de la Compania SC Enzime si Derivate, Costișa, Romania; cultura starter de *Lactobacillus plantarum* Vege Start 60 (liofilizată) de la Compania Christian Hansen, Danemarca, având o concentrație de $4,8 \cdot 10^{10}$ ufc/g.

2.2. Metode de analiză

Atât materia primă cât și băutura funcțională a fost caracterizată prin analize fizico-chimice, biochimice, imunologice și microbiologice.

2.2.1. Analize fizico-chimice și biochimice

2.2.1.1. *Conținutul de umiditate, respectiv substanța uscată (s.u.)* a fost determinat prin uscare la etuvă, conform metodei A.O.A.C., 1995.

2.2.1.2. *Determinarea conținutului de cenușă* s-a realizat prin metoda STAS 9/1988.

2.2.1.3. *Determinarea azotului total* s-a realizat conform metodei SR ISO 9037:2007.

2.2.1.4. *Determinarea conținutului de grăsime* a constat în extragerea substanțelor grase libere din proba de analizat cu eter de petrol, conform metodei A.O.A.C., 1995.

2.2.1.5. *Determinarea glucidelor reducătoare* s-a realizat prin metoda cu DNS, (acidul 3,5-dinitrosalicilic) conform metodei A.O.A.C.

2.2.1.6. *Determinarea conținutului de amidon* s-a efectuat prin metoda chimică, conform metodei A.O.A.C., 1995.

2.2.1.7. *Determinările conținuturilor de fibre totale și fibre insolubile* s-au realizat cu ajutorul kitului Megazyme total dietary fibre K-TDFR 05/12 de la Megazyme International Ireland.

2.2.1.8. *Determinarea pH-ului* a fost realizată conform metodei A.O.A.C., 1984.

2.2.1.9. *Determinarea acidității totale* conform metodei A.O.A.C. 1995.

2.2.1.10. *Analiza conținutului total de polifenoli* a fost realizată spectrofotometric folosind acid galic ca standard, conform metodei descrisă de International Organization for Standardization (ISO) 14502-1 (31) și Anesini (2008).

2.2.1.11. *Estimarea conținutului total de flavonoide* a fost realizată spectrofotometric folosind o metodă (Bozin, 2008).

2.2.1.12. Determinarea activității antioxidante prin metoda cu DPPH a fost realizată în conformitate cu protocolul de Brand - Williams (1995) cu modificări.

2.2.1.13. Analiza HPLC a aminoacizilor s-a realizat utilizând analizorul de aminoacizi DIONEX ICS-3000.

2.2.1.14. Analiza HPLC a compușilor fenolici a fost realizată prin metoda HPLC-DAD-MS, utilizând sistemul HPLC Agilent 1200 cu detector DAD cuplat cu detector MS singlequadrupole Agilent 6110.

2.2.1.15. Analiza FTIR s-a realizat pentru biomasă, utilizând echipamentul Magna-IR Spectrometer 350, prin înregistrarea spectrelor de la 4000 la 1000 cm^{-1} cu o rezoluție spectrală de 2 cm^{-1} , utilizând tehnica Atenuării Reflexiei Totale (ATR – Atenuator Total Reflectance).

2.2.1.16. Determinarea profilului mineral s-a realizat prin tehnica de fluorescență de raze X, folosindu-se instrumentul Niton Xlt 700 portabil (Niton Europe GmbH, Germany).

2.2.1.17. Determinarea compoziției corporale s-a realizat cu cântarul cu bioimpedanța OMRON BF-511.

2.2.1.18. Determinarea profilului lipidic sangvin s-a realizat la analizorul automat de biochimie ABX Pentra 400 (Horiba Medical, Franta). Kit-urile cu reactivi pentru determinarea parametrilor profilului lipidic: colesterol total, trigliceride, HDL-colesterol, au fost achiziționate de la aceeași firmă, Horiba Medical.

2.2.1.19. Metoda simulării, in vitro, a condițiilor gastrointestinale a presupus prepararea sucurilor simulate gastric și intestinal după metoda (Kos, 2000).

2.2.2. Analize imunochimice bazate pe reacția antigen-anticorp

2.2.2.1. Determinarea glutenului s-a realizat cu ajutorul kit-ului The R5 ELISA RIDASCREEN® Gliadin- Germania. Potrivit Codex Alimentarius (Alinorm 08/31/26) există două categorii de etichetare a produselor alimentare în funcție de conținutul de gluten:

- 1.) Produsele alimentare care conțin mai puțin de 20 ppm pot fi etichetate ca "glutenfree".
- 2.) Produsele alimentare etichetate drept "cu conținut foarte scăzut", pot avea un conținut de gluten de 20 până la 100 ppm.

2.2.3. Analize microbiologice

2.2.3.1. Determinarea numărului total de bacterii lactice s-a realizat prin cultivarea pe mediu de cultură MRS cu agar, în dublu strat, în plăci Petri sterile.

2.2.3.2. Determinarea drojdiilor și mucegaiurilor s-a realizat prin cultivare pe mediul MMA (must de malț agar), termostatare la temperatura de 25⁰C, timp de 3-5 zile.

2.2.3.3. Determinarea bacteriilor coliforme și a enterobacteriilor s-a realizat prin metoda tuburilor multiple. Mediul folosit a fost bulionul lactoză bilă-verde-brilant (BLBVB) cu plutitor (tub Durham). Confirmarea prezenței și identificarea enterobacteriilor (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp) s-a realizat prin cultivarea pe mediu Levine (EMB, cu eozină și albastru de metilen) în plăci Petri prin termostatare la temperatura de 37⁰C, timp de 24 de ore.

Metodele de analiză statistică și modelare

2.2.3.1. Analiza statistică a fost realizată cu ajutorul analizei factoriale ANOVA

2.2.4.2. Metodologia suprafeței de răspuns (MRS) și Designul experimental Box-Behnken au fost realizate cu ajutorul software-ului **DESIGN EXPERT 8.0.7.1**.

2.2.4.3. PCA (Analiza componentelor principale) a fost realizată cu ajutorul software-ului **XLSTAT (Win) 2011**.

2.2.4.4. Software-ul CurveExpert Professional 2.0.0. a fost conceput cu scopul de a realiza diferite corelații între parametrii care caracterizează procesul de fermentație.

CAPITOLUL 3

INFLUENȚA PROCESULUI DE GERMINARE ASUPRA COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN HRIȘCĂ

3.1. Introducere

Există multe definiții pentru germinare. Din punct de vedere fiziologic, germinația este definită ca apariția radicelei din semințe. Germinarea este procesul prin care semințele cresc, dând naștere la noua plantă (Coulibaly, 2011). Reprezintă singurul proces de prelucrare a produselor agroalimentare prin care se realizează o creștere importantă a valorii nutritive prin mărirea biodisponibilității compușilor nutritivi, a conținutului de vitamine, de bioelemente și a altor substanțe biologice active (Segal, 1991).

Germinarea s-a realizat în germinatorul automat EasyGreen (USA).

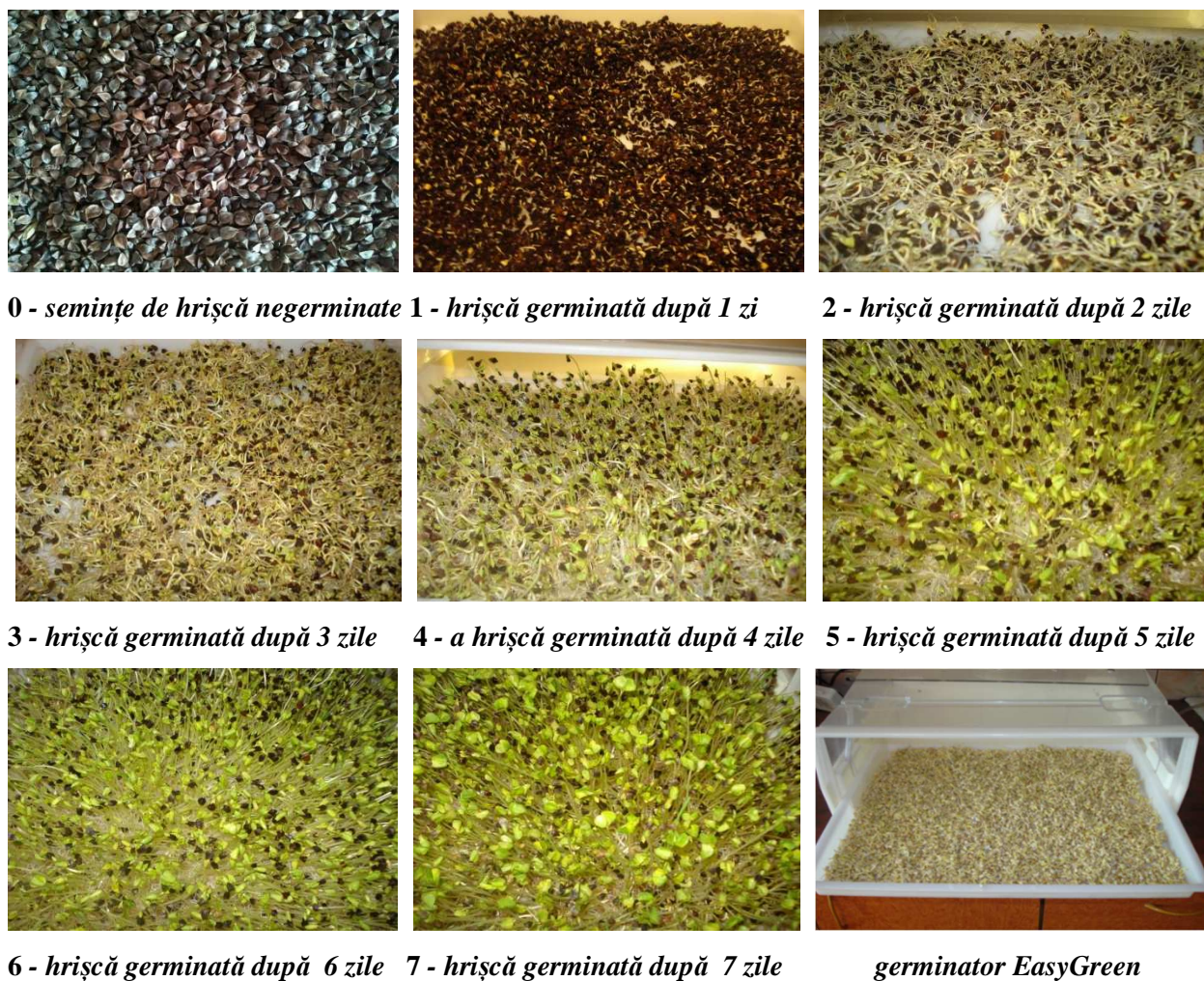


Figura 3.1. Semințele de hrișcă negerminate (0) și germinate timp de 7 zile (1-7)

3.2. Compoziția chimică

Conținutul de substanță uscată, cenușă, proteine, lipide, amidon și glucide reducătoare în timpul germinării semințelor de hrișcă sunt prezentate în **Tabelul 3.1**.

Tabelul 3.1. Compoziția chimică a semințelor înainte și după germinare

Analitul	Semințe uscate de hrișcă- 0	Germinare (zile)						
		1	2	3	4	5	6	7
Substanța uscată, %	90,17 ± 3,05	87,11 ± 2,56	79,11 ± 2,03	67,88 ± 2,58	56,78 ± 1,24	50,24 ± 1,13	45,63 ± 0,95	42,68 ± 0,52
Cenușă, g/100 g s.u.	2,11 ± 0,21	2,28 ± 0,35	2,35 ± 0,159	2,45 ± 0,475	2,93 ± 0,589	3,4 ± 0,974	3,64 ± 0,805	3,92 ± 0,391
Proteine g /100 g s.u.	11,76± 0,59	11,80± 1.11	11,95± 0,78	12,54± 0,17	13,22 ± 0,61	14,88± 0,52	16,20± 0,43	17,60± 0,44
Lipide, g/100 g s.u.	3,85 ± 0,55	3,71 ± 0,39	2,91 ± 0,44	2,32 ± 0,22	1,65 ± 0,28	1,48 ± 0,26	1,36 ± 0,31	1,30 ± 0,38
Glucide totale g/100 g s.u.	72,45	69,32	61,90	50,57	38,98	30,48	24,43	19,86

Amidon, g /100 g glucide totale	68.35 ± 5,29	64,85 ± 3,78	54.80 ± 5,33	44.92 ± 1,30	32,62 ± 7,03	22,68 ± 1,44	15,89 ± 2,47	10,16 ± 0,13
Glucide reducătoare mg /100 g glucide totale	69,54 ± 2,47	163,19 ± 0,12	396,79 ± 1,95	644,44 ± 5,33	785,55 ± 22,01	1222,03 ± 37,91	1244,62 ± 97,43	1270 ± 3,90
Fibre totale, g/ 100 g s.u.	4,03	4,31		5,01		6,58		8,43
Fibre insolubile g/ 100 g s.u.	2,97	3,03		3,37		4,78		6,18
Fibre solubile g/ 100 g s.u.	1,06	1,28		1,64		1,80		2,25
Valoare calorică, kcal/100g	364,5	349,7		259,8		172,7		154,8

Din **Tabelul 3.1** se observă că valoarea calorică a semințelor de hrișcă scade cu 54,53% pe parcursul germinării, de la 364,5 kcal în semințele negerminate, până la 154,8 kcal în ziua a șaptea de germinare. Datorită atât scăderii valorii calorice cât și creșterii activității biologice și a digestibilității înregistrate în semințele germinate, în ultimii ani, în țările occidentale a crescut consumul acestor alimente (Augustin și Klein, 1989; Ghorpade și Kadam, 1989; Frias și al 2007).

3.2.3. Evoluția conținutului de substanțe minerale. Conținutul de substanțe minerale crește în timpul germinării ($p < 0,001$). În **Figura 3.4** este prezentat graficul evoluției conținutului de zinc și crom pe parcursul germinării.

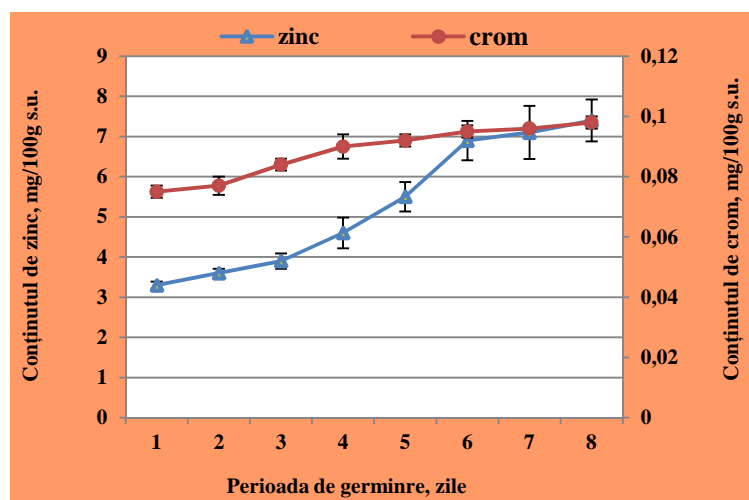


Figura 3.4. Evoluția conținutului de crom și zinc în timpul germinării

În semințele de hrișcă există un conținut de crom de 0,079mg/100g s.u. În timpul germinării conținutul de crom crește cu 30,66% ($p < 0,001$). Cromul este un oligoelement cu rol important în metabolismul glucozei și în sinteza acizilor grași și a colesterolului.

Zincul este un oligomineral esențial pentru viață, deoarece intră drept cofactor în structura a peste 300 de enzime (Coleman, 1998), fiind responsabil pentru acțiunea multor factori de transcriere (Kramer, 2006; Hershinkel, 2006). Conținutul de zinc în semințele de hrișcă este de 3,3 mg/100 g s.u. Prin legarea zincului, acidul fitic îi reduce solubilitatea în produsele alimentare și îi limitează utilizarea și reținerea în corpul uman (Cakmak, 2008). În timpul germinării, conținutul de zinc crește de 2 ori ($p < 0,001$). De asemenea, crește și biodisponibilitatea zincului, astfel încât hrișca germinată devine o sursă de zinc mult mai acceptabilă decât cerealele fortificate cu oxid de zinc (Diaz M, 2001; Lopez de Romana, 2003).

În **Figura 3.5.** este prezentată evoluția calciului și potasiului în timpul germinării semințelor de hrișcă.

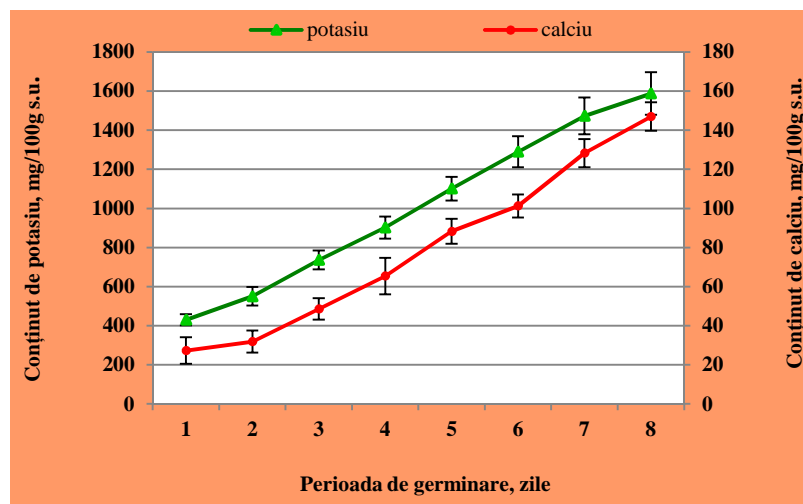


Figura 3.5. Evoluția conținutului de calciu și potasiu în timpul germinării

Conținutul de calciu din semințele de hrișcă este de 27,3 mg/100g s.u. După 7 zile de germinare conținutul de calciu crește de 5,5 ori ($p < 0,001$). BDA (The British Dietetic Association) recomandă un necesar zilnic de calciu de 500 mg pentru copii, 1000 mg pentru adolescenți și 700 mg pentru adulți. Se observă că 100 mg de hrișcă germinată după 7 zile acoperă o treime din necesarul zilnic al unui copil și o cincime din necesarul zilnic al unui adult (<http://www.bda.uk.com/foodfacts>).

Conținutul de potasiu în semințele de hrișcă este de 430 mg/100g s.u. După 7 zile de germinare conținutul în potasiu al semințelor de hrișcă crește de 3,6 ori ($p < 0,001$). Potasiul este un mineral esențial pentru viață, având rol în menținerea echilibrului acidobazic al organismului. Diverse studii epidemiologice au arătat corelația pozitivă între aportul alimentar de potasiu și sănătatea inimii și a oaselor (<http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/potassium>).

3.2.4. Evoluția conținutului de proteine. Conținutul în proteine a crescut de la 11,76 g/100g s.u. în semințele de hrișcă, la 17,60 g/100g s.u. după 7 zile de germinare ($p < 0,001$). În timpul germinării sunt activate proteazele, care conduc la eliberarea de aminoacizi și oligopeptide, crescând astfel conținutul de aminoacizi (Marero și al, 1989).

Analizând cromatograma HPLC a aminoacizilor din semințele de hrișcă, se constată că peak-ul dominant în semințele de hrișcă este arginina, cu un conținut de 312,95 mg/100g s.u. De asemenea, alanina și valina prezintă peak-uri importante. După șapte zile de germinare, se observă că treonina prezintă peak-ul dominant, având o creștere de 18 ori comparativ cu semințele negerminate. Serina, în semințele de hrișcă germinată, ajunge la un conținut de 166 mg/100g s.u. Creșteri importante prezintă și arginina și lizina, cu o creștere de 1,5 ori în semințele germinate după 7 zile.

Aminoacizii liberi cresc în embrion și în endosperm, până în zilele 8-10. Ulterior, odată cu acumularea de substanță uscată, concentrația aminoacizilor liberi scade (Horbowicz, 1992). Studiile au arătat că proteinele embrionare conțin cantități mai mari de arginină, serină, iar proteinele endospermului conțin mai multă lizină, alanină, metionină, leucină (Pomeranz și Robbins 1972; Pomeranz și al. 1975).

3.2.5. Evoluția glucidelor în timpul germinării. Amidonul este componenta de depozit a carbohidraților din hrișcă. El este acumulat în endosperm ca un compus energetic necesar pentru creșterea plantei. În hrișcă, conținutul de amidon variază de la 50% la 75% din masa uscată, demonstrând fluctuații în funcție de variabilele climatice și condițiile de cultivare (Qian și al., 1999). În timpul germinării au loc importante modificări în profilul glucidelor, conținutul total de glucide scăzând de la 72,45% în semințele negerminate, la 19,86% după șapte zile de germinare ($p < 0,001$).

Concomitent cu scăderea conținutului de amidon, are loc o creștere importantă de glucide libere, reducătoare ($p < 0,001$). Principala enzimă implicată în degradarea amidonului este amilaza. Creșterea activității amilazei în timpul germinării duce la degradarea amidonului în compuși care vor fi utilizați de embrion pentru producerea de energie necesară sintetizării de noi polizaharide pentru dezvoltarea viitoarei plante. Creșterea activității amilazelor și a maltazelor în timpul germinării, determină scăderea conținutului de amidon de la 68,35 g/100g s.u. la 10,16 g/100 g s.u., concomitent cu creșterea conținutului de glucide reducătoare de la 69,54 mg/100 g s.u. în semințele negerminate la 1270 mg/100 g s.u. după șapte zile de germinare.

Evoluția fibrelor alimentare. Fibrele alimentare constau din oligozaharide, polizaharide și alte derivate hidrofili (Gibson și al. 2000). Din punct de vedere nutrițional, fibrele alimentare totale

sunt clasificate în fibre alimentare insolubile și solubile. Hrișca este o sursă importantă de fibre alimentare.

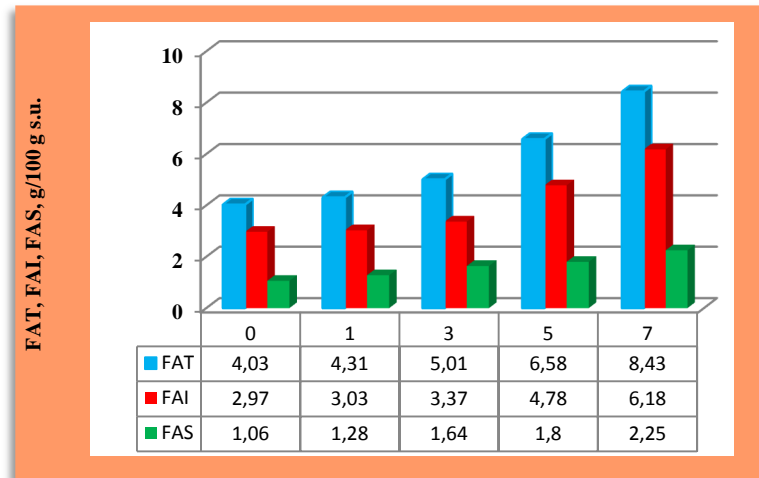


Figura 3.10. Evoluția conținutului de fibre alimentare în timpul germinării

În **Figura 3.10.** este prezentată evoluția fibrelor alimentare în timpul germinării semințelor de hrișcă. Se observă o creștere semnificativă ($p < 0,001$) pentru toate tipurile de fibre alimentare.

3.2.6. Evoluția conținutului de lipide. În timpul germinării se observă o scădere a conținutului de lipide cu 66,23%, de la 3,851g/100g s.u. la 1,298 g/100g s.u. Această scădere s-ar datora creșterii activității enzimelor lipolitice în timpul germinării (Raham și Aal, 1986), care hidrolizează lipidele în acizi grași și glicerol. Producții rezultați ar putea fi utilizați pentru sinteza de proteine sau ca sursă de energie pentru dezvoltarea embrionului (Obizoba, 1994; Nnam, 2000).

3.2.7. Prezența glutenului. Boala celiacă este o afecțiune autoimună rezultată din expunerea la gluten asociată cu interacțiunea dintre factorii de mediu și cei genetici (Green, 2007). Organismul persoanelor suferinde de celiachie, în momentul consumului de alimente ce conțin gluten, generează un răspuns autoimun care duce la apariția unei reacții antiinflamatorii la nivelul mucoasei intestinului. Rezultatul acestor expuneri se manifestă în primul rând prin probleme digestive, ulterior apărând deficiențele nutritive. Tratamentul sigur și eficient pentru marea majoritate a pacienților îl reprezintă în primul rând îndepărtarea glutenului din dietă (Tennyson, 2009).

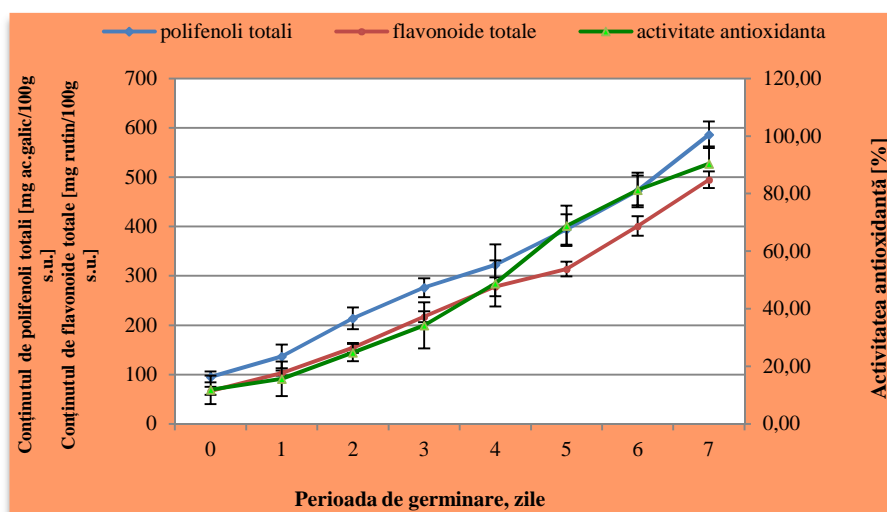
În **Tabelul 3.5** sunt prezentate atât valorile conținutului de gliadină cât și conținutul de gluten în semințele de hrișcă negerminate și germinate.

Se observă că atât semințele de hrișcă cât și hrișca germinată au un conținut glutenic mai mic de 10 ppm. Aceste produse pot fi catalogate "*glutenfree*" și folosite fără nici o problemă de către pacienții cu celiachie.

Tabelul 3.5. Valorile conținutului de gliadină și gluten în timpul germinării

Proba,	Ziua de germinare	Gliadină (ppm)	Gluten (ppm)
SH	0	4,41	8,83
SHG-1	1	4,31	8,63
SHG-2	2	4,19	8,38
SHG-3	3	3,97	7,95
SHG-4	4	3,88	7,77
SHG-5	5	3,48	6,97
SHG-6	6	3,02	6,04
SHG-7	7	3,17	6,34

3.2.8. Evoluția conținutului de antioxidanți. Atât nutriționiștii cât și cercetătorii și producătorii de alimente au devenit foarte interesați de alimentele bogate în polifenoli datorită proprietăților lor antioxidante puternice și implicit a efectelor deosebit de benefice asupra sănătății oamenilor. Din aceste considerente, se încearcă a se identifica modalități naturale de creștere a conținutului de compuși fenolici, conducând astfel la creșterea capacității antioxidante a alimentului. Germinarea semințelor reprezintă singura modalitate.

**Figura 3.12. Evoluția conținutului de antioxidanți în timpul germinării**

În studiul realizat, conținutul de polifenoli totali (**Figura 3.12**) a crescut de la 89 mg/100g s.u. în semințele de hrișcă la 780 mg/100g s.u. în semințele de hrișcă germinată ($p < 0,001$). Creșterea de aproape 9 ori a conținutului de polifenoli totali din acest studiu este în corelație cu studiile din literatură (Kim și al, 2004).

Conținutul de flavonoide totale crește de 7 ori în a șaptea zi de germinare. Cea mai mare cantitate de rutin se găsește în flori și în frunzele tinere. Conținutul în flavonoide pe perioada

vegetației este mai mare la subspecia *esculentum* decât la subspecia *tataricum* (Lahanov, 2004), scăzând după perioada înfloririi. Activitatea antioxidantă crește de 9 ori în timpul germinării celor 7 zile.

Analiza HPLC a semințelor de hrișcă a evidențiat prezența următorilor compuși fenolici: hidroxisecolariciresinol, epigalocatechina (EGC), epigalocatechingalat (EGCG) galocatechingalat (GCG), coumestrol, catechine, secolariciresinol, orientin, isoorientin, vitexin, rutin, isorhamnetin glucuronid, quercetin arabinosid, quercetin ramnosid, quercetin, isorhamnetin, luteolin, apigenin.

Krahl și colab (2008) au constatat că în semințele de hrișcă decorticate există doar rutin și vitexin, iar în semințele nedecorticate există toate cele 6 flavonoide caracteristice pentru hrișcă: rutin, quercetin, orientin, homoorientin, vitexin și isovitexin. În semințele de hrișcă din acest studiu au fost identificate următoarele flavonoide majore: rutin, vitexin, orientin, isoorientin, quercetin, quercitrin.

Zielinska și colab (2012) au identificat în semințele de hrișcă următoarele flavonoide: în principal rutin și quercetin, precum și myricetin, hyperosid, epicatechine și flavonele C-glucozidaze: orientin, homoorientin, vitexin, isovitexin. Aceleași flavonoide au fost identificate și de către Jiang și colab. (2007), Kalinova și colab. (2009), Zielinska și colab. (2010).

În a 3-a zi de germinare, s-a constatat că a crescut conținutul flavonolilor și flavonelor. Secolariciresinolul și hidroxisecolariciresinolul s-au redus cantitativ odată cu formarea flavonolilor. EGCG și catechinele se acumulează în plante, în funcție de intensitatea luminoasă și căldură, fiind mai mare în timpul anotimpului călduros (Yao și al., 2005).

Până în ziua a 7-a de germinare, are loc creșterea în continuare a conținutului de flavonoli, peak-ul dominant fiind reprezentat de vitexin, o creștere de aproape 20 de ori. S-a demonstrat că conținutul de rutin în frunze, nu și în flori, poate varia în timpul germinării, în funcție de nivelul intensității radiațiilor UV, fiind mai mic atunci când intensitatea radiațiilor este mai mică (Kreft, 2002).

Deși calea centrală pentru biosinteza flavonoidelor este conservată în plante, în funcție de specie și condițiile de mediu, un grup de enzime (cum ar fi izomerazele, reductazele, hidroxilazele, și mai multe dioxigenaze) modifică scheletul flavonoizilor de bază, ceea ce duce la diferite subclase de flavonoide (Martens și al., 2010).

Până în a 7-a zi de germinare, conținutul de lignani, secolariciresinol și hidroxisecolariciresinol se reduce cantitativ în continuare.

Conținutul de rutin prezintă o creștere de 15 ori în timpul germinării, de la 37,53 $\mu\text{g/g}$ până la 558,5 $\mu\text{g/g}$, în a șaptea zi de germinare. Lee și colab. (2004) au înregistrat o creștere a

conținutului de rutin de 19 ori, după șapte zile de germinare. Chen și colab. (2004) au înregistrat după zece zile de germinare creșteri ale conținutului de rutin de 4,11 ori, respectiv de 7,5 ori, în două soiuri de hrișcă comună.

Evoluția antioxidanților în timpul germinării poate fi analizată prin intermediul spectroscopiei în infraroșu. Aceasta este o metodă bazată pe vibrațiile atomilor unei molecule.

Un spectru IR conține benzi de absorbție datorate vibrațiilor care au loc simultan cu participarea tuturor atomilor din structura moleculelor compusului organic analizat (*vibrații normale*). O bandă de absorbție caracteristică aceleiași grupări funcționale se regăsește la aproape aceeași valoare a numărului de undă în spectrul IR al oricărei molecule (*vibrații caracteristice de grup*). Acest fapt permite identificarea elementelor structurale componente ale unei molecule, prin atribuirea benzilor de absorbție caracteristice din spectrul IR.

În conformitate cu fundamentele spectroscopiei IR sunt prezente 3 domenii de absorbție: 4000-2500 cm^{-1} (I), 2000-1500 cm^{-1} (II) și regiunea de amprentă digitală (fingerprint) (1500-400 cm^{-1}) (Stuart, 2004).

În semințele de hrișcă negerminate se înregistrează o bandă largă la 3273,8 cm^{-1} , care este dată, în special, de vibrațiile de întindere ale grupării -OH. Peak-ul de la 1636 cm^{-1} este datorat vibrațiilor de întindere a grupărilor carbonilice din acizii carboxilici, amide. Vibrațiile din regiunea fingerprint (600-1500 cm^{-1}) sunt date de prezența proteinelor, glucidelor, lipidelor.

În semințele germinate după 3 zile, se observă o creștere a peak-urilor în zona fingerprint, datorate creșterii concentrației de proteine și carbohidrați. Se înregistrează o creștere a transmitanței la 3278 cm^{-1} , prin acumularea grupărilor -OH din structura fenolilor.

În semințele germinate după 7 zile se înregistrează în continuare o creștere a transmitanței la 3282 cm^{-1} datorită creșterii concentrației flavonoidelor. Peak-urile învecinate, de la 2924 și 2853,1 cm^{-1} corespund vibrațiilor de întindere ale legăturii - C - H din interiorul grupărilor -CH₃ sau -CH₂ (Chis, 2010). Regiunea II prezintă o creștere considerabilă datorată vibrațiilor de întindere din grupările carbonilice, ca urmare a acumulării de acizi carboxilici și aminoacizi.

CAPITOLUL 4

OPTIMIZAREA PROCESULUI DE FERMENTARE CU BACTERII PROBIOTICE A EXTRACTULUI DE HRIȘCĂ GERMINATĂ

4.1. Introducere

Conform lui Shah (2007) și Chow (2002), cele mai utilizate probiotice sunt reprezentate de genurile *Lactobacillus*, *Streptococcus*, și *Bifidobacterium*, dar și alte organisme, sunt incluse ca probiotice, de exemplu enterococci și drojdii.

Lactobacillus plantarum este considerat probiotic (Holm, 2003; Soccol și al., 2010). Este o specie facultativ heterofermentativă, metabolic, foarte flexibilă și versatilă, întâlnită în multe nișe de mediu, precum și cu aplicații largi, de exemplu, drept cultură starter în fermentarea legumelor (Salovaara, 2004) și a cărnii (Ammor și Mayo, 2007), ca probiotic pentru oameni (Goossens și al., 2005) și în ultima vreme ca vehicul de livrare pentru compuși terapeutici (Pavan și al., 2000). Ca probiotic, *Lb. plantarum* are un mare potențial. Cercetările efectuate asupra rolului său în tratamentul sindromului de intestin iritabil au condus la rezultate care arată efectele pozitive în reducerea durerii, distensiei abdominale și a flatulenței (Bixquert, 2009). În plus, Nissen și colab.(2009) au arătat că, *in vitro*, *Lb. plantarum* poate spori activitatea metabolică a celulelor intestinale și, de asemenea, poate stimula răspunsul imun. Aportul de *Lb. plantarum* este indicat pentru a reduce anumite simptome gastro-intestinale în timpul tratamentului cu antibiotice (Lonnermark, 2009).

Inulina este considerată un prebiotic arhetipal, care apare în mod natural în multe alimente. Se compune din lanțuri de unități de fructoză cuplate prin legături- β -1,2, are o moleculă terminală de glucoză și este un poliglucid nereducător (Gibson, 1995). Datorită acestor legături, inulina este rezistentă la hidroliza enzimatică în tractul gastro-intestinal.

Mierea de hrișcă este un produs alimentar important și unic, care conține compuși bioactivi derivați de la albine și plante. Aceasta este bogată în acizi fenolici și flavonoide, care expun o gamă largă de efecte biologice, acționând astfel în calitate de antioxidanți naturali.

Scopul acestui studiu a fost de a investiga influența combinată a 3 variabile independente (cantitățile de miere, inulină și inocul de *Lb. plantarum*) pentru a obține o cantitate maximă de antioxidanți și o cantitate optimă de ufc/mL, cu un pH de asemenea optim.

4.2. Analiza statistică. Designul Box Behnken și metoda analizei suprafeței de răspuns au fost folosite pentru optimizarea compoziției băuturii fermentate. Toate experimentele au fost efectuate în triplicat și rezultatele au fost exprimate ca medie \pm deviație standard. Cele 15 loturi au fost pregătite pentru optimizare, folosind design-ul experimental Box Behnken (**Tabelul 4.1**)

Tabelul 4.1. Nivelul și codul fiecărei variabile independente folosind design-ul experimental Box Behnken

Variabile independente	Simbolul codului	Nivele		
		-1	0	+1
Concentrația de inulina (g/100mL)	A	1	2	3
Concentrația de miere (g/100mL)	B	1	5,5	10
Concentrația de inocul (mg/100mL)	C	0,2	10,1	20

4.8. Optimizarea globală. Pe parcursul celor 21 de zile au fost urmăriți parametrii: conținutul de polifenoli, conținutul de flavonoide, capacitatea antioxidantă, numărul de celule viabile (log ufc/mL) și pH-ul.

Este de dorit ca produsul odată obținut să fie consumat imediat, dar acest lucru nu se poate întâmpla mereu, de aceea el trebuie să prezinte caracteristicile nutriționale optime pe toată perioada de valabilitate, considerată a fi 21 zile.

Pentru a realiza optimizarea globală, s-au realizat mai întâi optimizările pentru fiecare variabilă dependentă (polifenoli, flavonoide, activitate antioxidantă, nr de celule viabile și pH) atât după terminarea fermentației, cât și după 7, 14 și 21 de zile. De fiecare dată a fost ales modelul Quadratic, deoarece $p < 0,05$ și valoarea lui F a fost mai mare de 1, având și cea mai mare valoare. De asemenea, valoarea “lack of fit” (lipsa de compatibilitate) $> 0,05$, arată că modelul este semnificativ statistic. Valoarea coeficientului de determinare R^2 arată cât de bine se potrivește modelul estimat. Cu cât R^2 este mai apropiat de 1, estimarea ecuației de regresie se corelează cu datele din eșantion. Valorile lui R^2 au avut valori cuprinse între 0,9955 și 0,9997. R^2 ajustat (coeficient de determinare ajustat) este o măsură de corelație pentru testarea lipsei de compatibilitate a ecuației de regresie. Astfel, valoarea ajustată a modelelor a fost cuprinsă între 0,9873 și 0,9994, ceea ce arată că 98,73%- 99,94% din variabilitatea răspunsurilor ar putea fi prezise de modele, și numai 1,27% - 0,06% din variațiile totale nu pot fi explicate de modele. Coeficienții de variație între 0,28% - 1,16%, destul de mici, arată că modelele au fost precise și fiabile.

Pentru toate cele 19 răspunsuri s-au putut stabili ecuațiile de regresie, pentru a putea afla, în orice moment, cantitățile de polifenoli și flavonoide, capacitatea antioxidantă, numărul celule viabile (log ufc/mL) și pH-ul. Modelul ecuației de regresie este de forma:

$$Y = b_0 + b_1 A + b_2 B + b_3 C + b_4 AB + b_5 AC + b_6 BC + b_7 A^2 + b_8 B^2 + b_9 C^2$$

în care A, B, și C sunt variabilele independente studiate și b_0 –intercept, $b_1 - b_9$ reprezintă coeficienți de regresie, constante pentru efectul procesului general, efectele linear și pătratic ale fiecărei variabile independente, precum și efectele de interacțiune între variabilele privind concentrațiile polifenolilor, flavonoidelor, inoculului, capacității antioxidante și a pH-ului. Soluția de optimizare este prezentată în **Figura 4.24**.

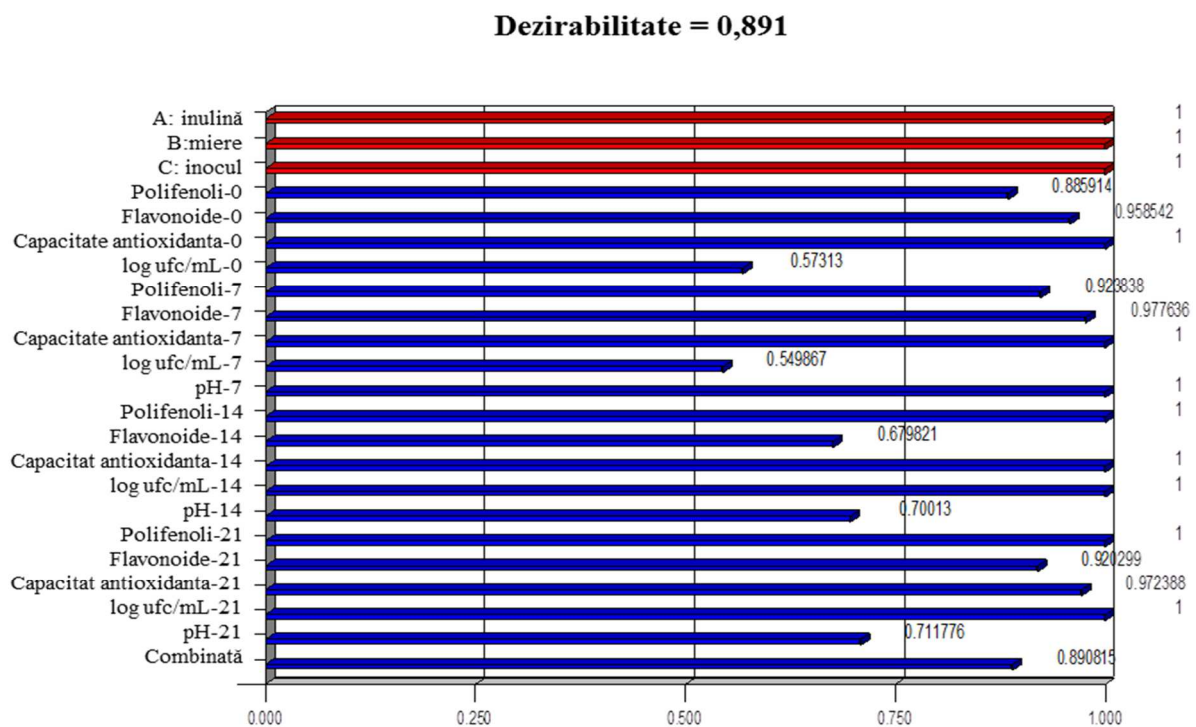


Figura 4.24. Soluția de optimizare cu răspuns multiplu de tip bară

În **Figura 4.24** sunt prezentate funcțiile parțiale de “dezirabilitate”. Funcțiile parțiale sunt apoi combinate într-un singur răspuns, așa numita funcție de dezirabilitate globală (combinată) care este definită ca medie geometrică a funcțiilor parțiale. O valoare diferită de zero a dezirabilității, implică faptul că toate criteriile selectate au fost într-o combinație bună. O valoare cât mai apropiată de 1 arată optimul combinațiilor.

CAPITOLUL 5

ANALIZA FIZICO-CHIMICĂ ȘI MICROBIOLOGICĂ A PRODUSULUI SINBIOTIC PE BAZĂ DE HRIȘCĂ GERMINATĂ

5.1. Introducere

Din cele mai vechi timpuri, oamenii au încercat să-și asigure, păstreze sau întărească sănătatea în mod natural. Băuturile funcționale joacă un rol important în viața zilnică a oamenilor. Consumatorii au început să aleagă de obicei acele produse care, pe lângă rolul hidratant și hedonic, asigură organismului suficienți compuși bioactivi cu efecte benefice asupra sănătății.

Fermentația, ca proces biotehnologic, este considerată una dintre cele mai vechi tehnologii, simplă, naturală și valoroasă. Bacteriile lactice sunt bacteriile principale responsabile de fermentarea produselor alimentare vegetale. Motivul fundamental pentru dezvoltarea și acceptarea de alimente fermentate poate fi atribuit proprietăților de conservare, îmbunătățirii proprietăților nutritive, creșterii cantității de substanțe biologic active, cu efecte benefice asupra sănătății (Kalantzopoulos 1997).

5.2. Compoziția chimică. În Tabelul 5.1. este prezentată compoziția chimică a băuturii pe bază de hrișcă înainte și după fermentație.

Tabelul 5.1. Compoziția chimică a băuturii pe bază de hrișcă

Parametru	Băutura nefermentată	Băutura fermentată
Substanța uscată, g/100mL	16,172 ± 1,009	15 ± 0,682
Proteine, g/100mL	0,564 ± 0,062	0,534 ± 0,056
Lipide, g/100mL	0,071 ± 0,009	0,070 ± 0,010
Cenușă g/100mL	0,167 ± 0,077	0,167 ± 0,071
Glucide totale, g/100mL	15,364	14,229
Glucide reducătoare, g/100mL	8,434 ± 0,662	7,78 ± 0,525
Glucide nereducătoare, g/100mL	6,912	6,449
Amidon, g/100mL	1,957 ± 0,872	1,578 ± 0,670
Fibre totale, g/100mL	4,655	4,571
Fibre insolubile g/100mL	0,953	0,953
Fibre solubile, g/100mL	3,702	3,618
Valoarea calorică, kcal /100 mL	46,88	39,6

Se observă că valoarea calorică a băuturii este foarte mică. La 100 mL de produs este o cantitate de 4,571 g fibre totale, din care 0,953 g fibre insolubile și 3,618 g fibre solubile. Prezența

fibrelor alimentare conferă o serie de beneficii sănătății consumatorului (Bengmark, S., și al, 2005): schimbă structura mucoasei favorizând creșterea acesteia; combate constipația, reduce producția de gaze de putrefacție, reduce răspunsul glicemic, reduce nivelul de trigliceride, colesterol, îmbunătățește absorbția mineralelor.

Se observă că substanța uscată a băuturii scade ca urmare a modificărilor produse la nivelul glucidelor. Cantitatea de proteine este ușor diminuată, cu 0,03 g/100 mL.

Reducerea ușoară a conținutului de proteine ar putea fi datorată hidrolizei, cu eliberarea de aminoacizi. Analizând cromatogramele HPLC a aminoacizilor din produsul nefermentat și din băutura fermentată, se înregistrează, corespunzător diminuării conținutului de proteine, creșteri mici ale aminoacizilor: treonină, glicină, fenilalanină (în proba fermentată). Trebuie amintit și faptul că aminoacizii liberi din lichidul inițial pot fi consumați de către *Lb. plantarum* pe parcursul perioadei de fermentare ca sursă de azot, justificând astfel scăderea conținutului de alanină și valină în băutura fermentată.

Se observă că nivelul lipidelor nu se modifică, cantitatea prezentă în băutură fiind foarte mică.

5.3. Identificarea prezenței gliadinei în băutura studiată a permis formularea de recomandări privind conținutul de gluten (*Tabel 5.3*).

Tabel 5.3. Conținutul de gliadină și de gluten în băutura fermentată

Proba	Gliadina (ppm)	Gluten (ppm)
Băutura fermentată	2,71	5,42

Se observă că băutura pe bază de hrișcă germinată are un conținut glutenic < 10ppm. Această băutură poate fi catalogată "*glutenfree*" și este recomandată pentru consum în cazul consumatorilor care suferă de celiachie.

5.4. Procesul de fermentație. Modificările biochimice și microbiologice în cursul procesului de fermentație și în perioada celor 21 de zile de depozitare la +4°C sunt prezentate în **Figura 5.3**.

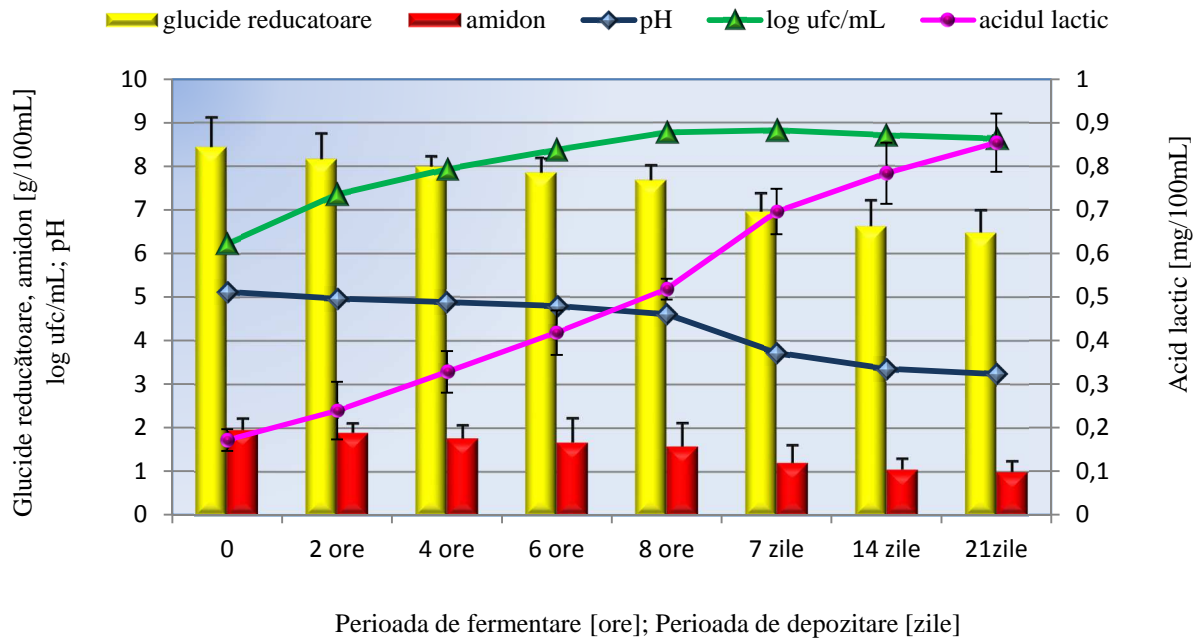


Figura 5.3. Modificări ale pH-ului, evoluția culturii *Lactobacillus plantarum*, aciditatea, consumul de glucide reducătoare și amidon în timpul fermentării și în perioada de valabilitate a băuturii pe bază de hrișcă germinată

Creșterea *Lactobacillus plantarum* are loc atât în timpul fermentației cât și în primele 7 zile de depozitare la +4°C. Băutura pe bază de hrișcă germinată conține o cantitate mare de zaharuri reducătoare, de 7,576 g/100 mL, adusă de mierea de hrișcă, ceea ce determină începerea fermentației imediat. Shamala și colab. (2000) au sugerat că mierea stimulează creșterea lactobacililor, în special *Lactobacillus acidophilus* și *plantarum*, în timp ce sucroza nu ar avea același efect. Se observă că în primele 2 ore de fermentare există cel mai mare consum de glucide reducătoare, de 0,275 g/100mL și cantitatea cea mai mică de amidon descompusă, 0,67g/100mL.

Creșterea celulară se realizează până în a 7-a zi de depozitare, având o valoare de 8,83 log ufc/mL. Conform studiilor de specialitate, se recomandă ca densitatea bacteriană în alimentele probiotice la momentul consumului să fie de cel puțin 10^7 ufc/mL. Până la sfârșitul perioadei de valabilitate/ depozitare la rece, se înregistrează o scădere de doar 0,36 log ufc/mL, ceea ce încadrează băutura pe bază de hrișcă germinată în normele alimentelor probiotice.

5.5. Variația compușilor fenolici și a activității antioxidante în timpul fermentării și a depozitării. În Figura 5.9 este prezentată variația concentrației polifenolilor totali și a flavonoidelor totale, precum și a activității antioxidante în timpul fermentației și pe perioada depozitării.

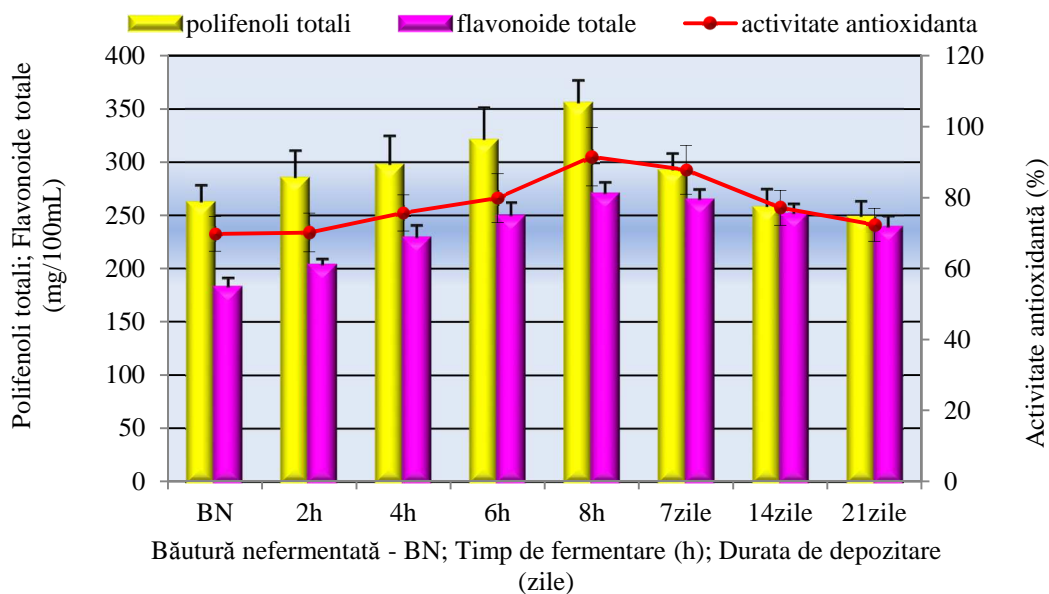


Figura. 5.9. Variația conținutului de compuși antioxidanți și a activității antioxidante în timpul fermentației și pe durata depozitării

Din **Figura. 5.9** se observă că, concentrația polifenolilor crește de la 262,23 mg/100mL la începutul fermentației, ajungând la sfârșitul acesteia la 355,17mg/100mL.

Majoritatea flavonoidele sunt în stare naturală în formă glicozilată. În timpul fermentației lactice se poate produce deglicozilarea și eliberarea de grupe hidroxil libere și agliconi, relevante, care pot contribui la îmbunătățirea proprietăților funcționale ale băuturii. Conținutul în flavonoide totale a crescut de la 158 mg/100mL la 249 mg/100mL la sfârșitul fermentației. Ca urmare, activitatea antioxidantă dependentă de evoluția compușilor polifenolici înregistrează o creștere, de la 69,78% în produsul nefermentat până la 91,55% la sfârșitul fermentației. În timpul depozitării celor 21 de zile, activitatea antioxidantă este în scădere, ajungând la 75,80%.

5.5.1. Analiza compușilor fenolici prin HPLC. Compușii din mierea de hrișcă și din băutura din hrișcă germinată au fost identificați cu compuși de referință și datele din literatură, pe baza timpilor de retenție HPLC și spectrelor de masă.

În produsul fermentat s-au înregistrat următoarele modificări cantitative ale flavonoidelor: hidroxisecolariciresinolul, EGC, catechinele, isorhamnetinul, au prezentat creșteri, ca urmare a adaosului din mierea de hrișcă. Catechinele au prezentat o scădere pronunțată în timpul celor 8 ore de fermentație. Cele mai mari creșteri s-au înregistrat în cazul flavonelor: vitexin, orientin, isoorientin, isorhamnetin. Creșterea cantității de luteolin este dorită, Varma (1977) sugerând că inhibă aldozreductaza care este considerată o enzimă cheie în evitarea complicațiilor datorate diabetului.

5.5.2. Analiza FTIR. Regiunea spectrală din zona 750 și 1500 cm^{-1} corespunde absorbției monozaharidelor, cum ar fi glucoza și fructoza și dizaharidelor, cum ar fi sucroza. (Tewari, 2005; Ozbalci și al., 2013). Regiunea $750 \div 900\text{ cm}^{-1}$ este caracteristică configurației zaharidelor. Benzile din regiunea $904 \div 1153\text{ cm}^{-1}$ sunt atribuite legăturilor de întindere C-O și C-C, iar benzile din jurul $1199 \div 1474\text{ cm}^{-1}$ sunt datorate modurilor de deformare ale O-C-H, C-C-H, și C-O-H. Banda de la 1008 cm^{-1} este considerată a proveni de la gruparea C-O, vibrație a inelului de glucoză observate la glucoză, maltoză și spectrele zaharoză (Ozbalci și al., 2013). Banda de la 1640 cm^{-1} se datorează vibrațiilor de întindere din interiorul amidelor, R-CO-NH-R. La $3237,2$ se observă o bandă foarte largă de absorbție, caracteristică legăturilor O-H, care poate fi datorată prezenței compușilor fenolici. Peak-urile caracteristice la frecvențele de la $922,4$, $864,8$, $816,8$, 776 cm^{-1} , prezente în miere, băutura nefermentată și băutura fermentată nu apar în extract, ceea ce denotă prezența glucidelor (din mierea de hrișcă).

Diferența dintre băutura nefermentată și băutura fermentată constă în valoarea diferită a transmitanței, fiind mai mare în cazul probei fermentate, ceea ce denotă acumularea de polifenoli.

5.6. Influența condițiilor gastrointestinale asupra viabilității culturii *Lactobacillus plantarum*. Pentru a-și exercita acțiunile benefice asupra sănătății omului, probioticele trebuie să ajungă la nivelul intestinului subțire într-o concentrație de cel puțin 10^7 ufc/mL.

În **Figura 5.15** este prezentată viabilitatea celulelor de *Lactobacillus plantarum* în urma expunerii, *in vitro*, a băuturii fermentate la acțiunile simulate a sucului gastric și a sucului intestinal.

Viabilitatea în zona gastrică este de $96,4\%$, în zona duodenală de 96% , astfel încât viabilitatea totală este de 92% . Se observă de asemenea că, după parcurgerea pasajului gastrointestinal rămân $8,16\text{ log ufc/mL}$, ceea ce înseamnă că băutura își menține proprietățile probiotice.

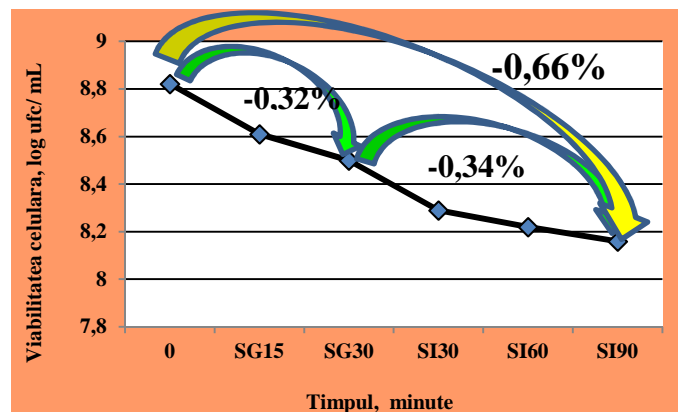


Figura 5.15. Evoluția viabilității bacteriilor lactice în sistem de simulare *in vitro* a condițiilor gastrointestinale

Factorii care influențează viabilitatea celulelor de *Lactobacillus plantarum* în condițiile de simulare gastrointestinale, *in vitro*, sunt reprezentați de cultura starter (*Lactobacillus plantarum*), extractul de hrișcă germinată, mierea de hrișcă, inulina și conținutul în antioxidanți.

Capacitatea celulelor de *Lactobacillus plantarum* de a rezista la condițiile gastrointestinale se datorează unei rezistențe intrinseci (Kashket, 1987), date de genomul său mare.

Hrișcă germinată, prin conținutul crescut de glucide reducătoare și azot liber, oferă surse de energie celulelor de *Lactobacillus plantarum* în tranzitul său. Michida (2006) a arătat, în studiile sale, că extractul de malt prezintă eficiență mai bună asupra viabilității celulelor de *Lactobacillus plantarum* în sistem de simulare *in vitro* a condițiilor gastrointestinale, decât extractul de cereale.

În studiile lor, Nazzaro (2012) și Buriti (2010) au arătat că inulina induce celulelor de *Lactobacillus plantarum* rezistență la stres, comparativ cu glucoza. Adeziunea probioticelor la suprafața enterocitelor și a celulelor mucoasale, prin autoagregare și coagregare în prezența inulinei, este de 10 ori mai mare decât în prezența glucozei (Nazzaro, 2012) sau a mierii (Saran și al., 2012). De asemenea, autoliza celulelor de *Lactobacillus plantarum* este mai mică în prezența inulinei decât a mierii (Saran și al., 2012).

5.7. Evoluția compușilor fenolici în sistem de simulare a condițiilor gastrointestinale, *in vitro*. Pentru a produce un efect biologic *in vivo*, este esențial ca compușii polifenolici extrași în băutura funcțională pe baza de hrișcă să ajungă în cantități suficiente în țesuturile țintă. Biodisponibilitatea acestor compuși este condiționată de absorbția lor din intestin, care la rândul ei este determinată de structura chimică și moleculară.

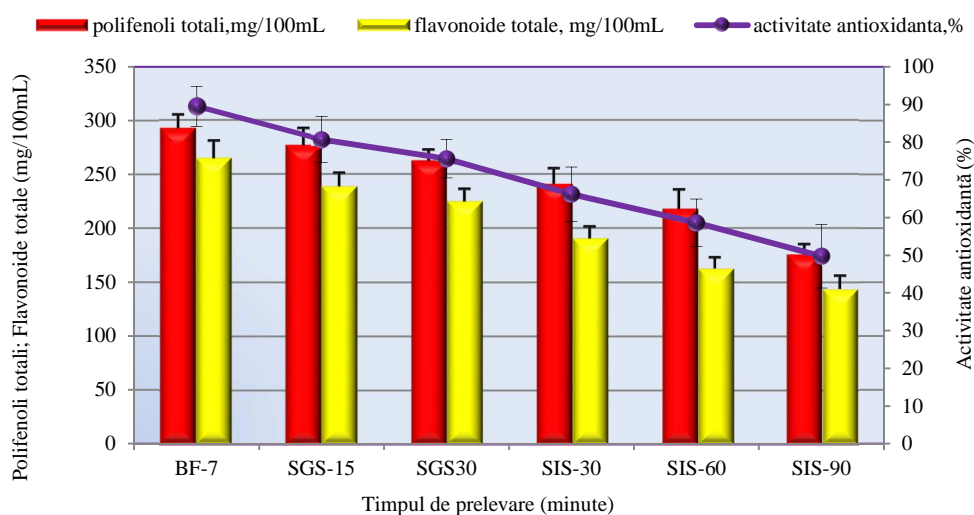


Figura 5.16. Evoluția compușilor fenolici în condiții de simulare gastrointestinală

BF – băutură fermentată după 7 zile; SGS-15 – suc gastric simulat după 15 minute; SGS-30 – suc gastric simulat după 30 de minute; SIS-30 – suc intestinal simulat după 30 de minute; SIS-60 – suc intestinal simulat după 60 de minute; SIS-90 – suc intestinal simulat după 90 de minute

Din **Figura 5.16** se poate observa că atât flavonoidele cât și polifenolii totali sunt influențați de mediul acid din stomac dar și de mediul alcalin din intestin. În pasajul gastric, concentrația polifenolilor totali scade cu 12%, iar pe pasajul duodenal scade cu 29,9%. În momentul absorbției vor fi absorbiți cu 41,9% mai puțini polifenoli față de aportul oral. Flavonoidele totale prezintă o scădere cu 13,46% în segmentul gastric și o scădere de 25,73% în segmentul intestinal, deci o scădere totală de 39,19%. Activitatea antioxidantă, care urmează profilul compușilor polifenolici, prezintă o scădere de 11,95% în zona gastrică, o scădere de 27,41% în zona intestinală, astfel încât există o scădere totală de 27,41%.

Se observă tendința generală de reducere a capacității antioxidante care urmează concentrația de polifenoli și flavonoide. Reducerea cantității de polifenoli și flavonoide se datorează atât mediului foarte acid ($\text{pH} = 2$) la nivel gastric și $\text{pH} = 8$ la nivel intestinal, cât și activității probioticului, prin enzima sa specifică, PAD.

În **Figura 5.17** sunt prezentate rezultatele obținute la analiza HPLC a compușilor cu acțiune antioxidantă existenți în băutura fermentată și în timpul simulării tranzitului gastro-intestinal, *in vitro*.

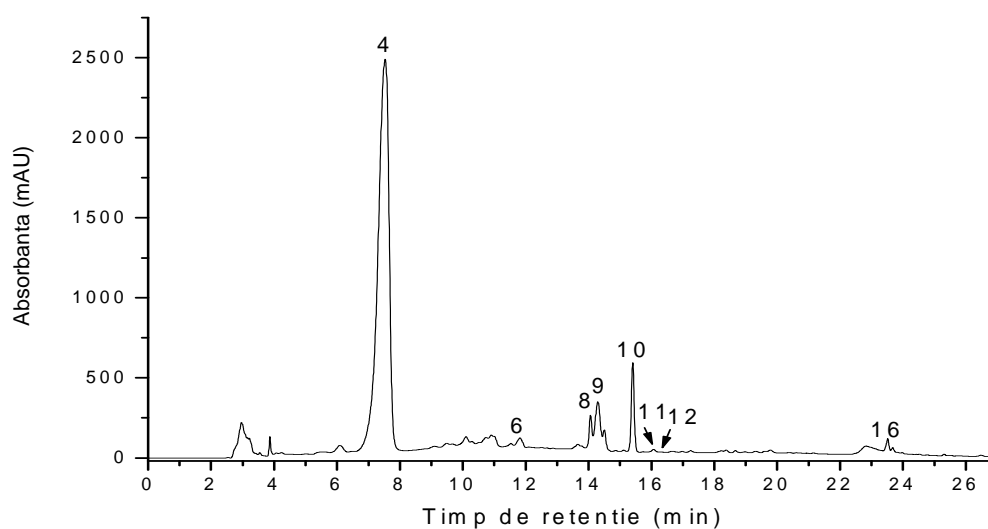


Figura 5.17. Cromatograma HPLC a conținutului polifenolic a băuturii funcționale după simularea gastrică, *in vitro* ($\lambda=280\text{nm}$)

4- galocatechingalat (GCG); 6- catechin; 8- orientin; 9- isoorientin; 10- vitexin; 11- rutin; 12- isorhamnetin glucuronid; 16- isorhamnetin;

În condițiile pH-ului acid, ale simulării gastrice, flavonoidele au suferit unele modificări. Concentrația flavonolilor a scăzut datorită hidrolizei legăturii glicozidice. Astfel, rutinul a fost hidrolizat la quercetin și isoquercitrin. De asemenea, concentrația flavonelor a scăzut.

Coumestrolul, membru al familiei izoflavonoide, prezent în băutură, provine atât din extractul de hrișcă cât și din mierea de hrișcă adăugată. Se observă că trecerea prin pasajul gastric nu îi afectează structura.

În timpul digestiei gastrice, hidroxisecoisolariciresinol este convertit la enterodiol și enterolactone (Ingram și al., 1997). Acest fitoestrogen este recunoscut pentru efectele sale preventive împotriva cancerului de sân, cancerului de colon, ateroscleroză și diabet. Catechinele prezintă creșteri foarte pronunțate. Acestea se datorează hidrolizei acide a procianidinelor și prodelphinidinelor din pericarpul de hrișcă, dar și din mierea de hrișcă, cu eliberarea monomerilor corespunzători.

În **Figura 5.18** se observă creșterea peak-ului 5, a coumestrolului, datorită faptului că la pH alcalin, acesta este eliberat din fragmentele de pericarp prezente în băutură. Georgetti și colab. (2013) și Lee și colab. (2006) au sugerat că coumestrolul ar avea o putere antiradicalică de 20 de ori mai mare decât genistein și daidzein. Nu în ultimul rând s-a sugerat ideea că ar putea avea acțiune antihepatotoxică și antiinflamatoare (Wong, 1988).

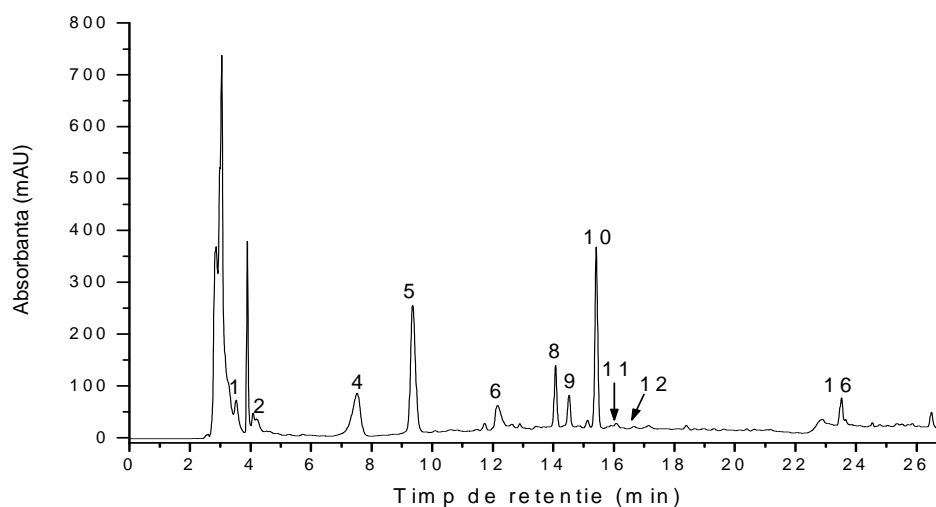


Figura 5.18. Cromatograma HPLC a conținutului polifenolic a băuturii funcționale după simularea intestinală, în vitro, $\lambda=280\text{nm}$: 1- hidroxisecolariciresinol; 2- epigalocatechina (EGC); 4- galocatechingalat (GCG); 5-coumestrol; 6- catechin; 8- orientin; 9- isoorientin; 10- vitexin; 11- rutin; 12- isorhamnetin glucuronid; 16- isorhamnetin; 18- apigenin

Conținutul în flavonoli se diminuează în continuare la pH-ul alcalin al intestinului, prin hidroliza legăturii glicozidice, dar într-o manieră mai blândă.

Instabilitatea catechinelor și epicatechinelor în sucul intestinal și sisteme tampon cu pH peste 7,4 a fost demonstrată anterior de către Yoshino și colab. (1999), Zhu și colab. (1997) și Sue (2003). La creșterea pH-ului catechinele suferă degradare oxidativă și polimerizare. De asemenea, catechinele cu grupări galoil-ester în poziția 3 sunt mai lent epimerizate, decât cele care nu au această grupare. În acest fel ar putea exista interacțiuni între inelul B și gruparea galoil din poziția 3, reducând stabilitatea catechinelor. Ei au mai constatat că în timpul epimerizării are loc un grad variabil de hidroliză a grupării galoil.

Amprenta FTIR a băuturii funcționale pe bază de hrișcă germinată este prezentată în Figura 5.19.

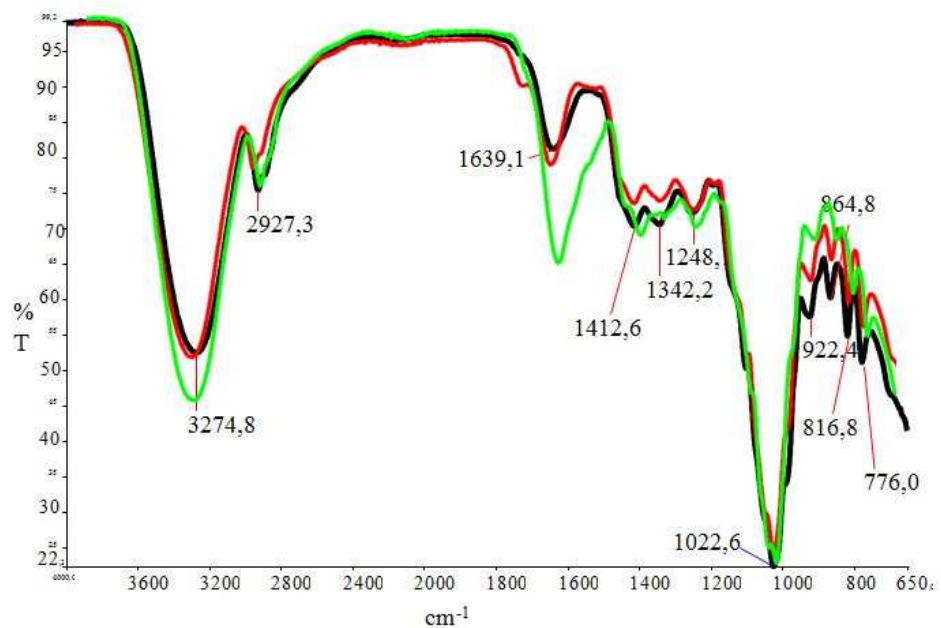


Figura 5.19. Spectrele rentă FTIR ale băuturii fermentate și în condiții de simulare gastro-intestinală

— Băutura fermentată; — băutura fermentată după simularea gastrică;
 — băutura fermentată după simularea intestinală

Se poate observa că, în spectrul vibrațional al simulării intestinale, s-a produs o creștere a benzii caracteristice grupărilor carbonilice, peak-ul de la 1639,1 cm^{-1} dată de reacțiile de oxidare și polimerizare ale catechinelor, cu eliberarea grupărilor galoil-ester.

CAPITOLUL 6

IMPACTUL BĂUTURII ASUPRA PARAMETRIILOR SANGVINI ȘI ANTROPOMETRICI

6.1. Introducere

Asocierea dintre consumul de flavonoizi pe termen lung și efectele asupra mortalității a fost subiectul multor studii și s-a sugerat că aportul de flavonoizi este invers corelat cu mortalitatea cauzată de bolile coronariene (Robak, 1996).

Cea mai importantă cale de metabolizare a colesterolului este transformarea lui în acizi biliari primari (acidul colic și chenodezoxicolic) în hepatocite, conjugarea cu glicocol sau cu taurină, și transformarea în săruri, în bilă. În intestinul subțire, după ce au participat la solubilizarea lipidelor alimentare și la absorbția acestora, acizii biliari sunt supuși unor transformări enzimatică catalizate de enzime ale florei bacteriene intestinale și transformarea în acizii secundari: acidul dezoxicolic (din acidul colic) și acidul litocolic (din acidul chenodezoxicolic). În segmentul distal al ileonului sunt reabsorbiți și, prin sistemul port, ajung la ficat unde sunt conjugați și împreună cu alți acizi biliari primari reiau circuitul (Popescu, 1991).

Prin centrifugare au fost obținute 4 fracțiuni lipoproteice majore:

- chilomicronii,
- LP cu densitate foarte mică (VLDL, de la very low density lipoproteins),
- LP cu densitate mică (LDL, de la low density lipoproteins),
- LP cu densitate mare (HDL, de la high density lipoproteins).

În practică se folosește mai des dozarea colesterolului din HDL, LDL.

HDL are rolul de a redistribui diferite fracțiuni lipidice, în cadrul unui proces numit transport invers al colesterolului. HDL acceptă colesterol de la celule și îl transportă fie la ficat, pentru excreție, fie la alte celule cu deficit al acestei lipide.

Indicele de masă corporală (IMC) este un indicator statistic a masei unei persoane raportată la înălțimea persoanei respective.

Analiza compoziției corporale cu ajutorul bioimpedanței electrice reflectă estimări ale următorilor parametrii: masa musculară, masa grasă, țesut adipos visceral.

Se presupune că concentrațiile maxime de flavonoide apar de obicei aproximativ la 2 ore după ingestia de alimente (Rein, 2000). La voluntarii sănătoși, timpul de înjumătățire variază, pentru quercetin fiind de 20-72 ore (Walle, 2001), cu condiția ca aportul alimentar suficient să fie susținut.

6.2. Pregătirea studiului

Studiul a fost efectuat în perioada 13 mai ÷ 20 iunie 2013. Lotul a fost realizat din 10 respondenți cu vârstă mai mare de 18 ani. Criteriile de includere au fost: modificări ale profilului lipidic sau ale compoziției corporale, cu regim normal de nutriție, fără alte suplimente alimentare. Criteriile de excludere se referă la prezența afecțiunilor acute sau cronice grave, tratament cu hipolipemiente în desfășurare, calitatea de fumător.

Băutura funcțională obținută din hrișcă germinată a fost administrată de trei ori pe zi, câte 50 mL, cu un sfert de oră înainte de masă.

Determinările parametrilor biochimici ai profilului lipidic au fost efectuate la începutul studiului, după 15 zile și la sfârșit: colesterol total, trigliceride, HDL-colesterol (HDL), LDL-colesterol (LDL), non-HDL și indicele aterogen.

Au fost determinați următorii parametri ai compoziției corporale: greutatea, IMC (indicele de masă corporală), masa musculară (MM), masa de grăsime (MG) și nivelul țesutului adipos visceral (GV). Acești parametri au fost determinați la cântarul cu bioimpedanță OMRON BF511 (Marea Britanie).

6.3. Rezultate și discuții

În Tabelul 6.1. sunt prezentate variațiile parametrilor lipidici sanguini, precum și variațiile parametrilor compoziției corporale ale celor 10 respondenți.

Tabelul 6.1. Variațiile parametrilor lipidici sanguini, precum și variațiile parametrilor compoziției corporale ale celor 10 respondenți

Parametru analizat	Înainte de studiu	După 2 săptămâni	După 5 săptămâni	Scăderea sau creșterea (valoare absolută)	Scăderea sau creșterea (%)
IMC (Kg/m ²)	30,75 ± 3,9	30,46 ± 3,95	30,1 ± 3,99	-0,65	-2,11
MM	27,15 ± 4,32	27,68 ± 4,46	28,66 ± 5,09	1,51	5,56
MG	39,34 ± 8,25	38,52 ± 7,95	37,55 ± 7,79	-1,79	-4,55
GV	11,1 ± 4,30	11,1 ± 4,30	10,5 ± 4,14	-0,6	-5,40
CT (md/dL)	250,42 ± 36,99	240,45 ± 36,52	228,1 ± 34,01	-22,32	-8,91
TG (md/dL)	170,82 ± 71,55	140,85 ± 36,48	126,13 ± 32,39	-44,69	-26,16
HDL (md/dL)	48,09 ± 9,07	48,96 ± 7,95	51,03 ± 8,23	2,94	6,11
LDL (md/dL)	168 ± 43,31	163,71 ± 38,18	151,15 ± 49,51	-16,85	-10,02
nonHDL (md/dL)	202,96 ± 39,71	191,88 ± 37,71	177,09 ± 36,44	-25,87	-12,74
IA	4,37 ± 1,26	4,03 ± 1,15	3,59 ± 1,05	-0,78	-17,84

Rezultatele sunt exprimate ca valori medii ale celor 3 loturi (lot1-înainte de studiu, lot2-după 2 săptămâni, lot 3-după 5 săptămâni) ± deviația standard. **IMC**, indicele de masă corporală; **MM**, masă musculară; **MG**, masă de grăsime; **GV**, grăsime viscerală; **CT**, colesterol total; **TG**, trigliceride totale; **HDL**, colesterolHDL; **LDL**, colesterol-LDL; **nonHDL**, colesterol-non-HDL; **IA**, indice aterogen.

Concluzii parțiale

- Ușoarele modificări ale compoziției corporale s-au obținut datorită modificărilor provocate de impactul direct al băuturii, prin scăderea aportului alimentar datorită senzației de sațietate induse, dar și indirect, prin interferența cu metabolismul lipidic.
- Prin urmare, suplimentarea dietei cu băutura pe bază de hrișcă germinată îmbogățită cu miere de hrișcă, inulină și fermentată cu *L. plantarum* oferă consumatorului reale efecte benefice asupra sănătății.
- Consumul acestei băuturi pentru o perioadă mai lungă de timp, evidențiază rezultate eficiente, putând constitui o alternativă nonfarmacologică de gestionare a factorilor de risc și de prevenire primară a aterosclerozei, dislipidemiei, obezității/supraponderabilității și implicit a afecțiunilor cardiovasculare.

CAPITOLUL 7.

CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE

7.1. Concluzii generale

Scopul acestui studiu a fost obținerea și caracterizarea unui produs funcțional pe bază de hrișcă germinată, cercetări realizate în premieră în țara noastră.

În prima etapă a cercetărilor semințele de hrișcă au fost supuse procesului de germinare, fiind monitorizate caracteristicile fizico-chimice, biochimice și microbiologice ale materie prime și produsului germinat. S-au constatat următoarele:

- Hrișca germinată după șapte zile are o valoare nutritivă superioară semințelor negerminate, crescând conținutul în aminoacizi, fibre alimentare și substanțe minerale. Prin scăderea conținutului de glucide și lipide, valoarea energetică scade, hrișca germinată putând fi folosită de persoanele cu diabet și obezitate. Lipsa glutenului recomandă hrișcă în nutriția persoanelor cu celiachie.
- Prin germinare, conținutul în antioxidanți și activitatea antioxidantă cresc foarte mult comparativ cu semințele negerminate. Aceste constatări sunt evidente atât prin analiza HPLC a compușilor antioxidanți, cât și în analiza FTIR.

➤ Prin conținutul de compuși bioactivi hrișca germinată după șapte zile poate fi considerată un aliment funcțional, recomandat atât în alimentația sănătoasă, cât și ca bază pentru alte alimente funcționale.

S-au studiat și optimizat parametrii biotehnologici pentru obținerea unei **băuturi funcționale pe bază de hrișcă germinată**:

➤ Prin optimizarea parametrilor fermentației lactice s-au stabilit concentrațiile de inulină, miere de hrișcă și de inoculul (cultura starter de *Lactobacillus plantarum*) pentru a obține o băutură care pe toată perioada de valabilitate, de 21 de zile, să aibă un conținut maxim de compuși antioxidanți, cu o activitate antioxidantă maximă și o viabilitate adecvată a bacteriilor lactice.

➤ Prin analiza componentelor principale s-a urmărit evoluția compușilor antioxidanți, a bacteriilor lactice și a compușilor prebiotici pe perioada de conservare a produsului fermentat, pe toată perioada termenului de valabilitate (21 de zile).

S-a analizat produsul finit din punct de vedere fizico-chimic și microbiologic și s-au stabilit următoarele concluzii:

➤ Prin fermentare, conținutul în antioxidanți a crescut, comparativ cu băutura nefermentată.

➤ Băutura funcțională prezintă o cantitate destul de mare de fibre alimentare.

➤ Conținutul în compuși antioxidanți și activitatea antioxidantă se mențin la valori ridicate pe toată perioada termenului de valabilitate.

➤ Caracterul probiotic al băuturii se menține, concentrația de bacterii lactice viabile având valori peste 10^8 ufc/mL pe toată perioada termenului de valabilitate.

➤ Prin simularea condițiilor gastrointestinale, *in vitro*, s-a constatat că băutura prezintă stabilitate chimică și microbiologică, atât în ceea ce privește conținutul de compuși antioxidanți, cât și de celule probiotice viabile.

S-a evaluat impactul pe care îl are băutura funcțională în exercită asupra profilului lipidic sangvin și compoziției corporale a zece respondenți, pe perioada a 5 săptămâni și s-au constatat următoarele:

➤ Există îmbunătățiri minore atât a profilului lipidic cât și a compoziției corporale, având în vedere timpul scurt de studiu.

➤ În literatură există studii efectuate separat, pentru observarea modificărilor după consumul de antioxidanți sau după consumul de probiotice sau după consumul de prebiotice.

➤ Este posibil ca prin consumul unui aliment care reunește toate cele trei componente: antioxidanți, probiotice și prebiotice, la concentrații optime, să realizeze în organismul uman modificări benefice, în special la persoanele cu dislipidemie și/sau supraponderabilitate.

7.2. Perspective

În perspectiva cercetărilor viitoare se propune:

✚ continuarea studiilor clinice cu băutura realizată în acest studiu, pe o perioadă mai lungă de timp și pe un număr mai mare de respondenți;

✚ urmărirea altor parametri și observarea modificărilor;

✚ efectuarea de studii clinice care vor urmări modificările produse de consumul de hrișcă germinate;

✚ continuarea încercărilor de dezvoltare a alimentelor funcționale pe bază de hrișcă.

Diseminarea rezultatelor cercetării

A. Articole științifice publicate în reviste cotate ISI:

1.BRAJDES (DUMITRU) C., BHRIM, G., DINICA, R., VIZIREANU, C. 2013. Phenolics composition and their biochemical stability confirmation by *in vitro*, gastrointestinal conditions simulation, for a new functional fermented beverage based on sprouted buckwheat, *Romanian Biotechnological Letters* –acceptat pentru publicare.

2.BRAJDES (DUMITRU), C., BHRIM, G., DINICA, R., APRODU, I., VIZIREANU, C. 2013. Development of a new functional beverage based on sprouted buckwheat (*Fagopyrum esculentum* MOENCH) extract, 2013. *LWT- Food Science and Technology*-în recenzie.

B. Articole științifice publicate în reviste indexate în baze de date internaționale

1. BRAJDES, C., VIZIREANU, C., 2012. Sprouted buckwheat an important vegetable source of antioxidants, *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati* Fascicle VI – Food Technology 36(1) 53-60

2. **BRAJDES, C., VIZIREANU, C.** 2013. Stability of *Lactobacillus plantarum* from Functional Beverage based Sprouted Buckwheat in the Conditions Simulating in the upper Gastrointestinal Tract, *GLOBAL RESEARCH ANALYSIS*, august 2013, <http://theglobaljournals.com/gra/>

C. Lucrări științifice comunicate la manifestări internaționale

1. **BRAJDES, C., VIZIREANU, C.** 2011. BUCKWHEAT SPROUTS, AN IMPORTANT VEGETABLE SOURCE OF ANTIOXIDANTS- poster; *The First PhD Student Symposium, Galati*, 17-18 decembrie 2011

2. **BRAJDES, C., VIZIREANU, C.** 2012. LE SARRASIN GERME - DES ALIMENTS FONCTIONNELS, *Conf. Internationala Le 7ème Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée (COFrRoCA)*, 27-29 iunie 2012 Bacau

3. DOBRE, I., **BRAJDES, C.**, SEREA, V., VIZIREANU, C., ALEXE, P. 2012 ÉVALUATION ET CLASSIFICATION DES DIFFÉRENTS TYPES DE MIEL SUR LA BASE DES ANALYSES PALYNOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES, *Conf. Internationala Le 7ème Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée (COFrRoCA)*, 27-29 iunie 2012 Bacau

4. **BRAJDES, c., VIZIREANU,** 2012. Application of Principal Component Analysis in the evolution of an antioxidant potential and probiotic drinks from sprouted buckwheat, *The Second PhD Student Symposium*, 13-14/12/2012

5. **BRAJDES, c., VIZIREANU,** 2013. Viabilitatea celulelor de *Lactobacillus plantarum* dintr-o băutură fermentată lactic, pe bază de hrișcă germinată, în sistem de simulare, *in vitro* a condițiilor gastrointestinale, *Conferința Școlii Doctorale Galați*, 17-18 Mai 2013

Referințe bibliografice selective:

1. Ammor, M.S. Mayo, B. 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci* 76, 138-146.
2. Anesini, C. 2008. Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Commercially Available Tea (*Camellia sinensis*) in Argentina, *J. Agric. Food Chem*, 56, 9225-9229.
3. Augustin. J., Klein, B.P. 1989.. In: Matthews R.H. (Eds). Legumes: Chemistry, technology and human nutrition Nutrient composition of raw, cooked, canned and sprouted legumes. . N. York, M. Dekker, 187-217.
4. Boehm, G., Stahl, B., Jelinek, J., Knol, J., Miniello, V., Moro, G. E. 2005. Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas. *Acta Paediatrica*, 94, 18-21

5. Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT Food Science and Technology*, 28, 25-30.
6. Bixquert J. M., 2009 Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics: an etiopathogenic approach at last. *Rev Esp Enferm Dig.* 101(8): 553-564.
7. Boeni, S., Pourahmad, R. 2012. Use of inulin and probiotic lactobacilli in synbiotic yogurt production. *Annals of Biological Research*, 3 (7), 3486-3491.
8. Bordei, D., Bahrim, G., Paslaru, V., Gasparotti, C., Elisei, A., Banu, I., Ionescu, L., Codina, G. 2007. Controlul calitatii in industria panificatiei. Metode de analiza. Editura Academica, Galati.
9. Brener, W. H. 1983, Regulation of the gastric emptying of glucose. *Gastroenterology*, 85 (1), 76-82.
10. Buruleanu, L. N. 2010. Study regarding some metabolic features during lactic acid fermentation. *Romanian Biotechnological Letters*, 15 (2), 5177-5188.
11. Cakmak, I. 2008. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification?, *Plant Soil*, 302, 1–17
12. Cao, G. P. 1999. Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. *Clin. Chem.*, 5, 574-576.
13. Chiang, Y. I. 2008. Study of anoxic and oxic cholesterol metabolism by *Sterolibacterium denitrificans*. *Journal of bacteriology*, 190(3), 905-914.
14. Chiș, A., Fetea, F., Abdelmoumen, T., Socaciu C. 2010. Application of FTIR Spectroscopy For A Rapid Determination Of Some Hydrolytic Enzymes Activity On Sea Buckthorn Substrate, *Romanian Biotechnological Letters* Vol. 15, No. 6, 5378-5744.
15. Chow, J. 2002. Probiotics and prebiotics: A brief overview, *J. Ren. Nutr.* 12, 76–86.
16. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION . 2008. *Thirty first Session Geneva, Switzerland, 30 June - 5 July*, REPORT OF THE 29th SESSION OF THE CODEX COMMITTEE ON NUTRITION AND FOODS FOR SPECIAL DIETARY USES, ALINORM 08/31/26 , www.codexalimentarius.net
17. Cohen, G. F. 1996. Nitric oxide regulates endothelium-dependent vasodilator responses in rabbit hindquarters vascular bed in vivo. *Am J. Physiol*, 271, 133-139.

18. Coleman, J.E. 1998. Zinc enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 222–234
19. Copikova, J. S. 2001. Application of FT-IR spectroscopy in detection of food hydrocolloids in confectionery jellies and food supplements. *Czech J.Foo Sci*, 19(2), 51-56.
20. Diaz, M., Rosado, J. L., Allen, L. H., Abrams, S., García, O. P. 2003 The efficacy of a local ascorbic acid-rich food in improving iron absorption from Mexican diets: a field study using stable isotopes. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 436-440.
21. Dobiasova, M. F. 2001. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER HDL). *Clinical Biochemistry*, 34, 583-588.
22. FAO, 2004. Protein Sources for the Animal Feed Industry
23. Ferreres, F, Ortiz, A, Silva, C, Garcia-Viguera, C, Tomás-Barberán, FA, Tomás-Lorente, F 1992, Flavonoids of “La Alcarria” honey - A study of their botanical origin. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 194, 139-143.
24. Forest, V., Clement, F., Meflah, K., Menanteau, J. 2003. Butyrate restores motile function and actin cytoskeletal network integrity in apc mutated mouse colon epithelial cells. *Nutr Cancer* 45, 84-92.
25. Frias J., C. Martínez-Villaluenga, P. Gulewicz, A. Perez-Romero, R. Pilarski, K. Gulewicz and C. Vidal-Valverde 2007. Biogenic amines and HL60 cytotoxicity of alfalfa and fenugreek sprouts. *Food Chem.* 105(3): 959-967.
26. Gee, J. D. 1998. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic. Biol.Med.*, 25, 19-25.
27. Georgetti,S., Casagrande, R., Vicentini, F., Baracat, M., Waldiceu, A., Fonseca, M. 2013. Protective Effect of Fermented Soybean Dried Extracts against TPA-Induced Oxidative Stress in Hairless Mice Skin, , *Hindawi Publishing CorporationBioMed Research International*, 1-8
28. Gheldof N, Wang X-H and Engeseth, N. J., 2002. Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5870-5877
29. Gheldof , N., Wang, X.H., Engeseth, N.J. 2003. Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem*, 51, 1500–5.

30. Gheldof, N., Engeseth N.J., 2002. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J. Agric Food Chem.*, 50: 3050– 3055, 2002 .
31. Ghorpade, V., Kadam, S. 1989. 165-176. Germination. In: Salunkhe D.K., Kadam S.S. (Eds). *CRC Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilization*. Boca Raton, FL. CRC Press.
32. Gibson, G.R., Williams, C.M., Guillon F. 2000. Defining dietary fibre. In: Gibson G.R., Williams C.M (eds): *Functional Foods*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, 316–317.
33. Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutrition*, 125, 1401-1412.
34. Goossens D, Jonkers D, Russel M, Stobberingh E, Van Den Bogaard A, Stockbrugger R. The effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition and metabolic activity in faeces of healthy volunteers: a placebo-controlled study on the onset and duration of effects. *Aliment Pharmacol Ther*, 18, 495–505.
35. Green, M.D., Cellier, C. 2007. Celiac Disease, *N Engl J Med.*, 357, 1731-1743
36. Hardie, D. 2004. AMP-activated protein kinase: a master switch in glucose and lipid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 5, 119-125.
37. Hershinkel, M. 2006. Zn²⁺, a dynamic signaling molecule. In *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*. 131– 152, Springer
38. Holasova, M., Fiedlerova, V., Smrcinova, H., Orsak, M., Lachman, J., Vavreinova, S. 2002. Buckwheat — the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Research International*, 35, (2) 207-211.
39. Holm, I. 2003. Gut health and diet: The benefits of probiotic and prebiotics on human health, *The World of Ingredients*, 2, 52–55.
40. Hollman, P. K. 2004. Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, 42, 74–83.
41. Holmes, D. F. 2008. The concept of precision extended to the atherogenic index of plasma. *Clin. Biochem.*, 41 (7-8), 631-5.

42. Horbowicz, M. Obendorf, R.L. 1992. Changes in sterols and fatty acids of buckwheat endosperm and embryo during seed development. *J. Agr. Food Chem.* 40, 745-750.
43. Iancu, C., Barbu, V., Nicolau, A., Iordachescu, G. 2010. Attempts to obtain a new symbiotic product. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 7, 21-29.
44. Ikeda, S., Yamashita, Y., Kusumotoi, K., Kreft, I. 2005. Nutritional characteristics of minerals in various buckwheat groats, *Fagopyrum* 22, 71-75.
45. Ingram, D., Sanders, K., Kolybaba, M. and Lopez, D. 1997. Case-control Study of Phytoestrogens and Breast Cancer. *Lancet* 350, 990-994.
46. Jaiswal, A., Gupta, S., Abu-Ghannam, N. 2012. Optimisation of lactic acid fermentation of York cabbage for the development of potential probiotic products. *International Journal of Food Science and Technology*, 1-9.
47. Jiang P., Burczynski F., Campbell C., Pierce G., Austria J.A., Briggs C.J. 2007. Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. Homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Res. Int.*, 40, 356–364
48. Kalantzopoulos G., 1997. Fermented products with probiotic qualities. *Anaerobe*, 3, 185–190
49. Kalinová, J., Vrchotová, N. 2009. Level of catechin, myricetin, quercetin and isoquercetin in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), changes of their levels during vegetation and their effect on the growth of selected weeds. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2719–2725
50. Khang, J., Chung, C., Kim, Y.S., Chun, H.N., Kim, E.R. 2003. Effect of germination on the nutritional value of buckwheat seed, *IFT-Annual Meeting, Chicago, Sesion 451*
51. Kaplan, H., and R. W. Hutkins. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2682–2684.
52. Karovicova, J. K. 2003. Lactic acid fermented vegetable juices. *Hort. SCI.* 30, 152-158.
53. Kim, S.L., Son, Y.K., Hwang, J.J., Kim, S.K., Hur, H.S., Park, C.K. 2001. Development and utilization of buckwheat sprouts as a functional vegetables. In: Ham, S.S., Y.S. Choi, N.S. Kim and e.H. Park, (eds .) *Advances in Buckwheat Research* (Proc. 8th IntI. Symp. Buckwheat at Chunchon, 653-660.

54. Kim Y.S., Kim, J.G. 2001. Studies on the Rutin Content and Fatty Acid Composition of Buckwheat Sprout, *The proceeding of the 8th ISB*, 561-563
55. Kos, B. S. 2000. Effect of Protectors on the Viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Food technol. biotechnol.* 38 (2), 121-127.
56. Kramer, U., Clemens, S. 2006. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants, molecule. In *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*. 216–271, Springer
57. Krahl, M., Back, W., Zarnkow, M., Kreis, S. 2012. Determination of Optimised Malting Conditions for the Enrichment of Rutin, Vitexin and Orientin in Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), *Journal of the Institute of Brewing*, 114 (4), 294–299.
58. Kreft, I. S. 2002. Nutritional properties of starch in buckwheat noodles. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 48, 47-50.
59. Kun, S. 2008. Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected Bifidobacterium strain. *Proc. Biochem*, 43, 816-821.
60. Kusnadi, J., Afriyan, T. 2012. The Growth of Probiotic Bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* in Skim Milk and Taro (*Colocasia esculenta* L. Schott Var. Boring) Flour Composite Medium, *International Conference on Environmental and Biological Sciences (ICEBS'2012) December 21-22, 2012 Bangkok (Thailand)*
61. La Casa C., Villegas I., de la Lastra C., Motilva V., Calero M.J., 2000. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J. Ethnopharm.*, 71, 45–53.
62. Lahanov, AP., Muzalevskaja, RS., Shelepina, NV., Gorkova, IV. 2004. Biochemical characteristics of some species of genus *Fagopyrum* Mill, *Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat, Prague*
63. Lee, M.H., Lee, J.S., Lee, T.R. 2004, Germination of Buckwheat Grain: Effects on Minerals, Rutin, Tannins and Colour, *Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat, Prague*.
64. Lonnermark, E., Friman, V., Lappas, G. 2010. Intake of *Lactobacillus plantarum* reduces certain gastrointestinal symptoms during treatment with antibiotics. *J Clin Gastroenterol.*, 44(2), 106-12

65. Lopez de Romana D, Lonnerdal B, Brown KH. 2003. Absorption of zinc from wheat products fortified with iron and either zinc sulfate or zinc oxide. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 279–283
66. Lopez-Lazaro, M. 2009. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini. Rev. Med. Chem.* 9, 31-59.
67. Lye, H. L. 2010. Mechanisms of Cholesterol Removal by Lactobacilli Under Conditions That Mimic the Human Gastrointestinal Tract. *Int Dairy J.*, 20, 169-175.
68. Lye, H. R. 2010. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *Journal of Dairy Science*, 93 (4), 1383-1392.
69. Marero, L.M., Payumo, E.M., Aguinaldo, A.R., Homma, S. 1989. Nutritional characteristics of weaning foods prepared from germinated cereals and legumes. *J. Food Sci.*, 53, 1399-1402
70. Manach, C. M., 1997. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett*, 409, 12-6.
71. Mandal, S., Chakraborty D., Dey, S. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses, *Plant Signaling & Behavior*, 5(4), 359-368
72. Martens S., Preuss A., Matern U. 2010. Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonols
73. Michida H. 2006. Effect of cereals extract and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 28, 73-78.
74. Mousavi, Z., Mousavi, M., Razavi, S., Hadinejad, M., Emam-Djomeh, Z., Mirzapour, M., 2013. Effect of fermentation by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* on functional properties of pomegranate juice. *Food Biotechnology*, 1-13.
75. Nagao, A. S., 1999. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 1787-90.
76. Nazzaro, F., Fratianni, F., Orlando, P., Coppola, R., 2012. Biochemical Traits, Survival and Biological Properties of the Probiotic *Lactobacillus plantarum* Grown in the Presence of Prebiotic Inulin and Pectin as Energy Source . *Pharmaceuticals*, 5, 481-492.
77. Nissen L., Chingwaru W., Sgorbati B. 2009. Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus* spp. Strains: a functional study in the small intestinal cell model. *Int. J. Food Microbiol.*, 135(3), 288-94.

78. Nnam, N.M., 2000. Evaluation of effect of sprouting on the viscosity, proximate composition and mineral content of hungary rice, acha (*Digiteria exilis*) flours. *Nig. Food J.*, 18, 57-62.
79. Obizoba, I.C., Atti, J.V. 1994. Evaluation of the effect of processing techniques on the nutrient and antinutrient contents of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) seeds. *Plant Food Hum. Nutr.*, 45, 23-24.
80. Ozbalci, B., Boyaci, I.H., Topcu, A., Kadılar, C., Tamer, U. 2013, Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks, *Food Chemistry*, 136, 1444-1452
81. Patterson, J.K., Lei, X.G., Miller, D.D. 2008. The Pig as an Experimental Model for Elucidating the Mechanisms Governing Dietary Influence on Mineral Absorption. *Exp. Biol. Med.*, 233, 651-664
82. Pavan S, Hols P, Delcour J, Geoffroy MC, Granette C, Kleerebezem M and Mercenier A. 2000. Adaptation of the nisincontrolled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study in vivo biological effects. *Appl Environ Microbiol*, 66, 4427-4432
83. Pomeranz, Y. Robbins, G.S. 1972. Amino acid composition of buckwheat. *J. Agr. Food Chem.* 20, 270-274
84. Pomeranz, Y., Marshall, H.G., Robbins, G.S., Gilbertson, J.T. 1975. Protein content and amino acid composition of maturing buckwheat. *Cereal Chem.* 52, 479-485
85. Popescu, A. C.-P., 1991. *Tratat de biochimie medicală*. București: Editura Medicală.
86. Raham, E.H. Aal, M.H. 1986. Changes in gross chemical composition with emphasis on lipid and protein fractions during germination of fenugreek seeds. *Food Chem.*, 22, 193-198.
87. REGULAMENTUL (CE) NR. 2073/2005 AL COMISIEI din 15 noiembrie 2005 privind criteriile microbiologice pentru produsele alimentare
88. Rein, D. L., 2000. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J. Nutr.*, 130, 2109S-2114S.
89. Rivera, L. M., 2008. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity* 16(90), 2081-7.
90. Robak, J. G., 1996. Bioactivity of flavonoids. *Pol. J. Pharmacol.*, 48, 555-564.

91. Roberfroid M.B., 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Journal Clinical Nutrition*, 71, 1682–1687
92. Roberfroid, M., 2007. Prebiotics: The Concept Revisited. *J. Nutr*, 137, 830S-7S.
93. Rossi, M. C., 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 6150- 6158.
94. Qian, J.Y., Mayer, D., Kuhn, M.1999. Flavonoids in fine buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Mönch) flour and their free radical scavenging activities. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 95, 343–349.
95. Salovaara H., 2004. Lactic Acid Bacteria in Cereal Based Products. In: S. Salminen, A. von Wright, and A. Ouwehand (ed.), *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd ed. Marcel Dekker, New York, p. 431452
96. Sanders, T., 1999. Food production and food safety. *British Medical Journal* 7199 (318), 1689-1693.
97. Sauer, J. R.-Z., 2007. Products formed during fermentation of the prebiotic inulin with human gut flora enhance expression of biotransformation genes in human primary colon cells. *British Journal of Nutrition*, 1, 97, 928–938
98. Saulnier, D. M., 2007. Identification of Prebiotic Fructooligosaccharide Metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through Microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1753-1765.
99. Schultz, H. B., 2007. Identification and quantification. *Vibrational Spectroscopy*, 43 (1), 13-25.
100. Shah, N.P. 2007. Functional cultures and health benefits, *Int. Dairy J.* 17 1262–1277.
101. Shamala, T.R., Jyothi, Y.S., Saibaba, P., 2000. Stimulatory effect of honey on multiplication of lactic acid bacteria under in vitro and in vivo conditions. *Lett. Appl. Microbiol.*, 30, 453–455.
102. Soccol , C.R. 2010. The Potential of Probiotics, *Food Technol. Biotechnol.* 48 (4) 413–434.
103. Spencer, J.P., Schroeter, H., Kuhnle, G., Srai, S,K., Tyrrell, R,M., Hahn, U., Rice-Evans, C. 2003. Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human

- fibroblasts from oxidative stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *Biochemical Journal*, 354, 493–500.
104. Sroka, Z., Bełz J. 2009. Antioxidant activity of hydrolyzed and non-hydrolyzed extracts of the inflorescence of linden (*Tiliae inflorescentia*). *Adv. Clin. Exp. Med.*, 18, 329-335
105. Stuart, B., 2004. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. John Wiley & Sons.
106. Sun, T., Ho, C-T. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts, *Food Chemistry* 90, 743-749
107. Tennyson, S.K.L., Lewis, S., Green, P.H.R., 2009. New and developing therapies for celiac disease, *Therap Adv Gastroenterol*, 2(5), 303-309.
108. Tofan, C., Bahrim, G., Nicolau, A., Zara, M. 2002. Microbiologia produselor alimentare. Tehnici si analize de laborator, Editura AGIR, București
109. Varma, S.D., Mizuno, A., Kinoshita, J.H., 1977. Diabetic cataracts and flavonoids. *Science*, 195, 205-206.
110. Vodnar, D., Ranga, F., Pop, O., Socaciu, C. 2012. Catechin-rich Tea Extracts Improve the *Lactobacillus casei* Growth During Lactic Fermentation, *Bulletin UASVM Agriculture*, 69(2), 1843-5386
111. Walle, T. W., 2001. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J. Nutr.*, 131, 2648-2652.
112. Wang, W. G., 2009. AMP-activated protein kinase and cancer. *Acta Physiol*, 196, 55-63.
113. Wang, Z., Pan, Z., 2011. Extracts of phenolics from Pomegranate Peels, *The Open Food Science Journal*, 5, 17-25
114. WHO. Cardiovascular Disease, Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, World Health Organization, 2011.
115. Wu, C. 2011. Rutin inhibits oleic acid induced lipid accumulation *via* reducing lipogenesis and oxidative stress in hepatocarcinoma cells. *Journal of food science*, 76 (2), 35-72.
116. Yao, L., Caffin, N., D'arcy, B., Jiang, Y., Shi, J., Singanusong, R., Datta, L., Kakuda, Y., Xux, Y., 2005. Seasonal Variations of Phenolic Compounds in Australia-Grown Tea (*Camellia sinensis*), *J. Agric. Food. Chem.*, 53(16), 6477-83

117. Yoshino, M., Haneda, M., Naruse, M., Murakami, K., 1999. Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-20-deoxyguanosine in DNA. *Mol. Genet. Metab.* 68, 468–472.
118. Zielińska, D., Turemko, M., Kwiatkowski, J., Zieliński, H., 2012. Evaluation of Flavonoid Contents and Antioxidant Capacity of the Aerial Parts of Common and Tartary Buckwheat Plants, *Molecules*, 17, 9668-9682.
119. Zielińska, D., Szawara-Nowak, D., Zieliński, H., 2010. Determination of the antioxidant activity of rutin and its contribution to the antioxidant capacity of diversified buckwheat origin material by updated analytical strategies, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 60 (4), 315-321
120. Zielinski, H., Kozłowska, H., 2000. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6, 2008-2016.
121. Zhu, Q., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y., Chen, Z. 1997. Stability of Green Tea Catechins, . *Agric. Food Chem.*, 45, 12, 4624–4628
122. <http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/potassium>
123. <http://www.bda.uk.com/foodfacts>
124. <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/atglance.htm>
125. <http://www.ilsio.org/Europe/Pages/FUFOSE.aspx>
126. <http://www.XLSTAT.com>
127. http://www.statease.com/dx8_man.html