

**MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII  
UNIVERSITATEA DUNĂREA DE JOS DIN GALAȚI  
FACULTATEA DE ȘTIINȚA ȘI INGINERIA ALIMENTELOR**

**INFLUENȚA PROCESĂRILOR BIOTEHNOLOGICE  
ASUPRA CALITĂȚILOR NUTRIȚIONALE ȘI SENZORIALE  
ALE LEGUMINOASELOR USCATE**

**- REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT -**

**Conducător științific,  
Prof. dr. ing. Rodica SEGAL**

**Autor,  
ing. Gratiela Victoria BARZĂ (BAHACIU)**

**GALAȚI  
2011**

UNIVERSITATEA "DUNĂREA DE JOS" DIN GALAȚI

**DECIZIA**  
nr. 3322 / 21.10.2011

În conformitate cu Ordinul Ministrului Educației și Cercetării nr. 3461 / 23.03.1998;  
conform aprobării Senatului Universității din data de 05.03.2009, de mandatare a  
Biroului Senatului Universității pentru aprobarea comisiilor de susținere publică teză doctorat;  
conform aprobării Biroului Senatului Universității în ședința din data de 17.10.2011;  
în baza Ordinului Ministrului Educației, Cercetării și Tineretului nr. 3287/25.02.2008  
privind confirmarea rectorului;

**RECTORUL UNIVERSITĂȚII**  
**d e c i d e :**

**Art. 1.** Se numește comisia pentru evaluarea și susținerea tezei de doctorat de către  
doctorandul(a) ing. BARZĂ M. GRATZIELA-VICTORIA(BAHACIU), Domeniul de doctorat  
- Inginerie industrială, în următoarea componență :

- 1. Președinte:** Prof.univ.dr.ing. Petru ALEXE  
*Decan – Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor*  
*Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați*
- 2. Conducător  
de doctorat:** Prof.univ.dr.ing. Rodica SEGAL  
*Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați*
- 3. Referent oficial:** Prof.univ.dr. Ștefana JURCOANE  
*Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București*
- 4. Referent oficial:** Prof.univ.dr. Cristina DIACONESCU  
*Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București*
- 5. Referent oficial:** Conf.univ.dr.ing. Luminița-Anca GEORGESCU  
*Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați*

**Art. 2.** Prorectoratul cu activitatea de doctorat și Secretariatul Rectorat-Doctorat vor  
aduce la îndeplinire prevederile prezentei decizii.



***Fiului meu,***

### **Înainte de toate ...**

Mulțumesc lui Dumnezeu pentru că m-a răsfățat cu darurile Lui: mi-a dat niște PĂRINȚI minunați care m-au iubit, m-au educat și mi-au dat libertatea să aleg cum și ce vreau să devin; mi-a scos în cale un om extraordinar, SOȚUL meu, cel mai bun prieten și iubit, dar și cel mai temut cenzor al meu, omul care a crezut în mine tot timpul, m-a încurajat și mi-a dovedit că pot mai mult; m-a dăruit cu băiatul meu minunat, TUDOR, care, cu inteligență, umor și empatie mă învață zilnic să zâmbesc, să iubesc, să mă bucur și care mi-a iertat cu generozitate infinită absența emoțională din ultima perioadă; mi-a dăruit o FAMILIE mare, inimoasă și puternică, cu frați, surori și rude apropiate, un izvor de energie, bunătate și ajutor, pe care uneori am abuzat accesându-l; mi-a oferit PRIETENI buni, COLEGI minunați și nu în ultimul rând m-a făcut ceea ce sunt, un OM fericit și împlinit.

Doresc să mulțumesc doamnei Profesor universitar doctor Rodica Segal pentru îndrumarea competentă, critica constructivă, răbdarea și profesionalismul cu care a însoțit relația noastră pe lungul parcurs al elaborării acestei lucrări.

Aduc recunoștința și mulțumirile mele doamnei Profesor universitar doctor Cristiana Diaconescu pentru sprijinul moral și profesional pe care mi l-a acordat cu generozitate.

Gândurile și recunoștința mea se îndreaptă și către domnul Profesor universitar doctor Petru Alexe, care a crezut în mine încă de când eram studentă, care m-a susținut și m-a încurajat să mă autodepășesc.

Mulțumesc de asemenea tuturor oamenilor inimoși care mi-au oferit ajutor în elaborarea acestei teze de doctorat: doamnei Conferențiar universitar doctor Liliana Bădulescu de la Centrul de Cercetare pentru Studiul Calității Produselor Agroalimentare din cadrul Universității de Științe Agronomice și Medicină Veterinară, București, doamnelor Nastasia Belc și Mariana Ionescu de la Institutul de Bioresurse Alimentare, precum și ICA Research and Development, pentru sprijinul în elaborarea unor determinări experimentale.

Fără ajutorul, sprijinul, gândurile și cuvintele dumneavoastră, lucrarea aceasta nu ar fi existat.

Gratiela Victoria BAHACIU

## CUPRINS

|   | pagina |
|---|--------|
| <b>INTRODUCERE:</b> Importanța pe plan național a leguminoaselor ca alimente funcționale                                | 1      |
| <b>CAPITOLUL 1. LEGUMINOASELE</b> .....   | 5      |
| 1.1. Orientări actuale în nutriție – Alimentele funcționale .....   | 5      |
| 1.2. Locul leguminoaselor într-o alimentație sănătoasă .....  | 6      |
| 1.2.1. Caracteristici nutriționale și funcționale ale leguminoaselor .....  | 6      |
| 1.2.1.1. Valoarea nutritivă a leguminoaselor .....  | 7      |
| 1.2.1.2. Valoarea funcțională a leguminoaselor .....  | 11     |
| 1.2.1.2.1. Izoflavonele .....   | 12     |
| 1.2.1.2.2. Oligoglucidele .....   | 25     |
| 1.2.1.2.3. Saponinele .....   | 29     |
| 1.2.1.2.4. Acidul fitic .....   | 30     |
| 1.2.1.2.5. Inhibitorii proteici .....   | 31     |
| <b>CAPITOLUL 2. MODALITĂȚI DE ÎMBUNĂTĂȚIRE A CALITĂȚILOR NUTRIȚIONALE ȘI SENZORIALE ALE LEGUMINOASELOR USCATE</b> ..... | 32     |
| 2.1. Considerații generale .....  | 32     |
| 2.2. Nivelul și digestibilitatea proteinelor .....  | 33     |
| 2.3. Nivelul glucidelor .....   | 34     |
| 2.4. Nivelul fitaților .....  | 37     |
| 2.5. Nivelul inhibitorului tripsinic .....  | 39     |
| 2.6. Nivelul și biodisponibilitatea mineralelor .....   | 40     |
| 2.7. Germinarea. Transformări biochimice în leguminoase prin germinare .....  | 43     |
| 2.8. Fermentarea semințelor de leguminoase .....  | 49     |
| 2.8.1. Produse fermentate obținute din leguminoase .....  | 50     |
| 2.8.2. Microorganisme care produc fermentația lactică .....   | 54     |
| <b>CAPITOLUL 3. STUDII EXPERIMENTALE</b> .....  | 59     |
| <b>3.1. Premize, obiective, scop</b> .....  | 59     |
| <b>3.2. Materiale și metode de prelucrare</b> .....   | 60     |
| 3.2.1. Germinarea boabelor de soia .....  | 60     |
| 3.2.2. Mediul fermentativ .....   | 61     |
| 3.2.3. Fermentarea boabelor de soia .....   | 61     |
| <b>3.3. Metode de analiză</b> .....   | 62     |
| 3.3.1. Determinarea extractului solubil .....   | 63     |
| 3.3.2. Determinarea pH-ului .....   | 64     |
| 3.3.3. Determinarea acidității titrabile a mediului fermentativ .....   | 64     |

|   |             |
|---|-------------|
| 3.3.4. Determinarea numărului total de bacterii lactice (Metoda culturala Koch prin inoculare în masa mediului solidificat) ..... | 64          |
| 3.3.5. Determinarea glucidelor prin metoda HPLC .....   | 66          |
| 3.3.6. Determinarea compușilor cu azot .....  | 68          |
| 3.3.7. Determinarea inhibitorului tripsinic .....   | 71          |
| 3.3.8. Determinarea sărurilor minerale asimilabile .....  | 72          |
| 3.3.8.1. Fosforul anorganic .....   | 72          |
| 3.3.8.2. Ionii metalici .....   | 73          |
| 3.3.9. Determinarea vitaminei B <sub>1</sub> prin HPLC .....  | 78          |
| 3.3.10. Evaluarea activității antioxidante - metoda cu o-fenantrolină .....   | 79          |
| 3.3.11. Analiza senzorială .....  | 81          |
| <b>3.4. Metode de prelucrare și interpretare a rezultatelor .....</b>   | <b>85</b>   |
| <b>3.5. Rezultate și discuții .....</b>   | <b>86</b>   |
| 3.5.1. Influența procesării biotehnologice asupra caracteristicilor boabelor de soia .....  | 86          |
| 3.5.1.1. Extractul solubil .....  | 86          |
| 3.5.1.2. pH-ul și aciditatea titrabilă .....  | 94          |
| 3.5.1.3. Evoluția numărului de bacterii lactice .....   | 98          |
| 3.5.1.4. Evoluția glucidelor solubile .....   | 104         |
| 3.5.1.4.1. Glucidele solubile după germinare .....  | 104         |
| 3.5.1.4.2. Glucidele solubile din soia fermentată lactic după germinare .....   | 108         |
| 3.5.1.4.3. Oligoglucidele din soia germinată și fermentată lactic .....   | 123         |
| 3.5.1.5. Evoluția cantității de azot .....  | 127         |
| 3.5.1.5.1. Azotul solubil (neproteic) .....   | 127         |
| 3.5.1.5.2. Azotul aminic .....  | 135         |
| 3.5.1.6. Evoluția inhibitorului tripsinic .....   | 143         |
| 3.5.1.7. Evoluția nivelului de fosfor anorganic .....   | 150         |
| 3.5.1.8. Conținutul mineralelor ușor asimilabile .....  | 155         |
| 3.5.1.8.1. Calciul solubil (Ca <sup>2+</sup> ) .....  | 156         |
| 3.5.1.8.2. Fierul absorbabil (Fe <sup>2+</sup> ) .....  | 164         |
| 3.5.1.8.3. Magneziul solubil (Mg <sup>2+</sup> ) .....  | 172         |
| 3.5.1.8.4. Nivelul de zinc solubil (Zn <sup>2+</sup> ) .....  | 179         |
| 3.5.1.9. Evoluția vitaminei B <sub>1</sub> .....  | 186         |
| 3.5.1.10. Activitatea antioxidantă a boabelor de soia germinate și fermentate lactic .....  | 196         |
| 3.5.2. Evaluarea senzorială a boabelor de soia procesate biotehnologic .....  | 203         |
| <b>CONCLUZII FINALE .....</b>   | <b>214</b>  |
| <b>BIBLIOGRAFIE .....</b>   | <b>2224</b> |
| <b>LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ÎN DOMENIUL TEZEI DE DOCTORAT .....</b>   | <b>249</b>  |

## STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat cuprinde 250 pagini și este structurată în două părți distincte: studiul documentar prezentat în 58 pagini (8 figuri, 1 tabel) și studiul experimental care conține 192 pagini (117 figuri, 28 tabele, 9 relații matematice).

Bibliografia conține 358 titluri din care 22 titluri până în anul 2000, 165 titluri între 2000-2004 și 171 titluri între 2005-2011.

În rezumat sunt prezentate pe scurt obiectivele științifice, materialele și metodele de lucru, rezultatele experimentale, concluziile finale și perspectivele de continuare a cercetărilor, precum și o listă selectivă a titlurilor bibliografice.

### INTRODUCERE: Importanța pe plan național a leguminoaselor ca alimente funcționale

„An apple a day keeps the doctor away” („un măr pe zi poate ține doctorul la distanță”) o paradigmă ce poate fi considerată a fi fost prima reclamă la alimentele funcționale.

Alimentele funcționale sunt cele care dau oportunitatea de a reduce riscul bolilor și de a promova starea de bine a organismului, fără a solicita aportul vreunui specialist în mod explicit.

Un număr din ce în ce mai mare de consumatori au devenit mai informați și în același timp au căpătat abilitatea de a-și controla sănătatea pe parcursul vieții prin îmbunătățirea stării lor actuale de sănătate și/sau luptând împotriva îmbătrânirii sau a viitoarelor boli. Combinând interesul consumatorilor cu evoluțiile tehnologiei, a dovezilor clinice referitoare la legătura dietă-boală, precum și evoluțiile în prevenirea bolilor, au oferit oportunitatea fără precedent de a îmbunătăți starea generală de sănătate a oamenilor.

Încă din timpuri foarte vechi, în Orient oamenii dezvoltau tehnologiile de fermentare și/sau germinare ale leguminoaselor pornind de la premiza utilizării resurselor materiale pentru a-și produce alimente cât mai aromate, mai gustoase, în funcție de tradițiile și obiceiurile specifice fiecărei zone și culturi.

Boabele de soia sunt bogate în proteine de calitate superioară, glucide, uleiuri cu un conținut ridicat de acizi grași nesaturați și compuși biologic activi, cu acțiune benefică asupra stării generale de sănătate a organismului, precum și asupra prevenirii unor boli degenerative grave, precum cancerul (de sân, de col uterin, de colon, de prostată), diabetul zaharat, boli cardiovasculare sau în prevenirea și reducerea simptomelor asociate menopauzei.

Inițial, interesul pentru produsele din soia a apărut datorită izoflavonelor și a potențialului lor efect asupra activității estrogenice, precum și ca utilizare a produselor din soia în alimentația animalelor în vederea creșterii acestora (promotori ai creșterii). Izoflavonele s-au dovedit a fi estrogeni slabi, atât în studiile efectuate in vitro, cât și în cele in vivo, manifestând  $10^{-4}$ – $10^{-2}$  din activitatea estrogenică a  $17 \beta$ -estradiolului. În ciuda potențialului lor slab, izoflavonele exercită efecte fiziologice deoarece s-a observat la persoanele care au consumat produse din soia concentrații ale izoflavonelor în sânge de câteva ori mai mari decât cele ale estrogenilor fiziologici. (Mora Escobedo, 2009).

Izoflavonele reduc oxidarea LDL-colesterolului care poate conduce la ateroscleroză, și îngroșarea sângelui care poate conduce la atacuri cerebrale și cardiace. În plus, izoflavonele pot preveni sau stopa dezvoltarea cancerului de prostată la bărbați. Ele pot preveni degradarea ADN-ului și apariția mutațiilor deoarece acționează ca antioxidanți, blochează creșterea vaselor sanguine tumorale (factorii antiangiogeni) și inhibă celulele tumorale (Paxton, 2000).

Izoflavonele intensifică activitatea izoenzimelor hepatice P450 și a prostaglandin sintetazei și reduc metabolismul benzpirenului.

Studiile epidemiologice retrospective au atribuit izoflavonelor capacitatea de a reduce riscul cancerului de sân la grupurile de vegetarieni și asiatici cu un nivel ridicat al excreției urinare de izoflavone. Studiile pe animale au arătat o reducere de cel puțin 50% a tumorilor de sân și prostată, comparativ cu incidența acestora la grupul de control (care nu au consumat soia). Există peste 200 de lucrări științifice care au investigat efectul genisteinei asupra inhibiției in vitro a celulelor canceroase mamare, de prostată, colon, plămân, piele și leucemie.

Studiile in vivo pe animale au arătat că genisteina inhibă direct tumorile de piele și colon; ea este un bun antioxidant, un inhibitor puternic al tirozinkinazei (concentrația tirozinkinazei în țesutul epitelial mamar este un bun indicator al malignității); teoria pe care se bazează efectul antitumoral al genisteinei este aceea că, dacă poți inhiba activitatea acestei enzime se poate stopa transformarea celulelor sănătoase în celule canceroase.

Genisteina provoacă diferențierea celulelor tumorale și acționează ca un factor antiangiogeneză încetinind creșterea tumorii și previne creșterea celulelor canceroase. În plus, genisteina influențează ateroscleroza prin efectele ei antitrombină, iar calitățile sale antioxidante previn oxidarea LDL-colesterolului. Prin adăugarea izoflavonelor în dietă, nivelul colesterolului poate scădea cu până la 35%. Un studiu recent a arătat că genisteina a inhibat dezvoltarea celulelor canceroase ale prostatei și este posibil să întârzie instalarea cancerului de prostată cu 15-20 de ani (Paxton, 2000).

În același timp, fructooligozaharidele (FOS) din boabele de soia, deși au efecte nedorite de flatulență datorită fermentării lor în intestinul gros, proces care implică participarea microbiotei acestuia). În urma acestui proces rezultă hidrogen, metan și dioxid de carbon, precum și acizi grași cu catenă scurtă (acetat, propionat, butirat), care sunt rapid absorbiți și metabolizați de organism: acetatul trece imediat în sânge, ajunge în ficat, mușchi și alte țesuturi; butiratul este metabolizat de colonocite și se pare că are rol în reglarea creșterii celulare, induce diferențierea celulelor și moartea acestora (FAO, 2007).

Datorită scăderii pH-ului ca urmare a metabolizării FOS de către bifidobacterii, s-a înregistrat și o scădere a numărului bacteriilor patogene (*Clostridium*) care au fost asociate cu sindromul morții subite la copii, diaree și producerea unor substanțe de putrefacție care contribuie la encefalopatie. Metabolizarea FOS în acizi grași cu lanț scurt și scăderea pH-ului facilitează absorbția calciului în intestinul gros măbind densitatea oaselor.

Prin adăugarea în dietă a FOS poate fi manipulată balanța colesterolului. Cercetările arată că adăugarea FOS determină intensificarea eliminării colesterolului prin inhibarea circulației enterohepatice a acestuia. Acest fapt se poate datora inhibării enzimelor bacteriene care convertesc acizii biliari în forme mai ușor de absorbit (Nadeau, 1999).

Există dovezi considerabile care sugerează faptul că microbiota și pH-ul colonului joacă un rol deosebit în riscul asociat cancerului de colon, iar consumul alimentelor cu FOS asigură protecție împotriva leziunilor neoplazice ale colonului.

Există însă și alte aplicații promițătoare ale FOS: colita ulcerosă se pare că rezultă din "înfometarea" celulelor epiteliale ale colonului, iar acidul butiric rezultat din metabolizarea acestor compuși reprezintă substratul preferat al acestor celule.

De asemenea, FOS pot proteja ficatul prin reducerea metaboliților rezultați prin degradarea tirozinei, cei care participă la encefalopatie. În bolile renale, modificarea nivelului de azot la nivelul colonului prin modularea activității enzimelor bacteriene poate conduce la scăderea azotului uric în sânge.

Simultan însă există și compuși care reduc valoarea nutritivă și senzorială a boabelor de soia, precum inhibitorii tripsinici (prin reducerea gradului de utilizare și digestibilitatea proteinelor), acidul fitic (care determină reducerea biodisponibilității mineralelor).

Leguminoasele au fost astfel intens studiate pentru a justifica și fundamenta științific recomandarea lor ca alimente funcționale. Ele sunt o sursă excelentă de proteine, fibre alimentare, micronutrienți și substanțe biologic active (soia este unică printre leguminoase deoarece reprezintă o sursă concentrată de izoflavone) cu rol extrem de important în asigurarea unei stări optime de sănătate, precum și în prevenirea sau reducerea riscului unor boli.

Și în țara noastră există un consum important de leguminoase, în special mazăre, fasole și soia și ca urmare s-au dezvoltat tehnologii de prelucrare, în special cele de extrudare a soiei și de obținere a izolatelor sau concentratelor proteice din soia. Acestea sunt utilizate ca atare sau ca ingrediente în diferite produse alimentare (în produse din lapte, carne, înghețată, biscuiți, pâine etc.).

Numeroase studii demonstrează posibilitatea diversificării alimentelor obținute din leguminoase prin diverse prelucrări biotehnologice. Astfel, sunt cunoscute o multitudine de produse rezultate în urma unor procese fermentative. De o bună apreciere se bucură în prezent și semințele germinate sau germenii acestora care se consuma în salate.



Deși germinarea conduce la o creștere evidentă a valorii nutritive a boabelor de leguminoase și obținerea unor alimente bogate în compuși bioactivi, comercializarea lor în stare proaspătă ridică probleme privind conservarea chiar pe un timp limitat și în condiții optime. Procesele fiziologice declanșate de germinare generează compuși simpli care în condițiile umidității ridicate a boabelor devin medii ideale pentru dezvoltarea microorganismelor de alterare. În același timp, gustul și mirosul specific-neplăcut nu dispar în totalitate. Aceste inconveniente ar putea fi eliminate printr-o continuare a procesării biotehnologice folosind bacterii lactice.

Pornind de la aceste premize, lucrarea își propune să investigheze caracteristicile nutriționale și senzoriale ale boabelor de soia fermentate lactic după o prealabilă prelucrare biotehnologică prin germinare.

### 3. STUDIU EXPERIMENTAL

#### 3.1. Premize, obiective, scop

Deși germinarea conduce la o creștere evidentă a valorii nutritive a boabelor de leguminoase și obținerea unor alimente bogate în compuși bioactivi, comercializarea lor în stare proaspătă ridică probleme privind conservarea chiar pe un timp limitat și în condiții optime. Procesele fiziologice declanșate de germinare generează compuși simpli care în condițiile umidității ridicate a boabelor devin medii ideale pentru dezvoltarea microorganismelor de alterare. În același timp, gustul și mirosul specific-neplăcut nu dispar în totalitate. Aceste inconveniente ar putea fi eliminate printr-o continuare a procesării biotehnologice folosind bacterii lactice.

Pornind de la aceste premize, lucrarea a avut ca scop studiul influenței a două procese biotehnologice combinate asupra calității senzoriale și nutriționale ale boabelor de soia.

Pentru îndeplinirea scopului propus, lucrarea a avut în vedere realizarea următoarelor obiective:

1. Realizarea simultană a celor două procese biotehnologice respectiv germinarea și fermentația lactică a boabelor de soia;
2. Evaluarea modului în care aceste procesări biotehnologice contribuie la îmbunătățirea calităților senzoriale și a valorii nutritive a boabelor de soia. Aceasta s-a realizat prin:
  - Studiul evoluției principalilor compuși nutritivi ai boabelor de soia, respectiv extractul solubil, glucidele solubile, azotul neproteic și aminic, vitaminele din grupul B, activitatea antioxidantă;
  - Studiul evoluției unor factori antinutriționali din boabele de soia în timpul prelucrării biotehnologice (glucidele de flatulență, acidul fitic, inhibitorul tripsinic);
  - Studiul gradului de biodisponibilizare a mineralelor (calciu, fier, magneziu, zinc și fosfor anorganic) prin germinare urmată de fermentație lactică;
  - Studiul influenței procesărilor biotehnologice asupra caracteristicilor senzoriale ale boabelor de soia.
3. Identificarea posibilităților de utilizare în alimentație și recomandări de consum pentru boabele de soia prelucrate biotehnologic prin germinare și fermentare lactică.

#### 3.2. Materiale și metode de prelucrare

Boabele de soia ajunse la maturitate au fost supuse germinării în condiții dirijate și apoi au fost introduse într-un mediu de fermentație reprezentat de extract de tărâțe de grâu fermentat lactic.

##### 3.2.1. Germinarea boabelor de soia

Semințele au fost spălate cu apă de la robinet, clătite de două ori cu apă distilată iar suprafața lor a fost sterilizată prin imersie în soluție de hipoclorit de sodiu 1% timp de 10 minute. După aceea, boabele au fost clătite de trei ori cu apă distilată și zvântate într-un termostat la 40°C.

S-au păstrat semințe în stare negerminată, iar celelalte au fost înmuiate 12 ore în apă de la robinet în proporție de 1:4 (v/v), apoi spălate și germinate pe hârtie de filtru îmbibată cu apă, menținerea umidității făcându-se printr-un sistem de capilaritate.

Germinarea boabelor de soia a fost condusă în condiții controlate, timp de 4 zile la temperatura de 25°C (condițiile optime de germinare – din literatura de specialitate) (Oboh, 2000, 2006, Khalid, 2009).

### 3.2.2. Mediul fermentativ

S-a utilizat un mediu fermentativ produs industrial de firma SC Alidan Serv SRL cu următoarele caracteristici prevăzute în certificatul de conformitate:

*Proprietăți senzoriale:*

- Aspect: lichid opalescent, fără sediment grosier, fără impurități vizibile. Se admite un ușor sediment;
- Culoare: gălbuie, cu ușoară nuanță cafenie;
- Gust: acrișor, plăcut, caracteristic, fără gust amar sau alt gust străin.
- Miros: plăcut, caracteristic.

*Proprietăți fizico-chimice:*

- pH, max. 2,5
- substanța uscată solubilă: min. 3%

*Proprietăți microbiologice:*

- bacterii lactice: min.  $1 \times 10^7$  UFC/ml

Mediul fermentativ a fost analizat sub aspectul pH-ului și al numărului de bacterii lactice.

### 3.2.3. Fermentarea boabelor de soia

Boabele de soia germinate 4 zile la 20°C au fost spălate cu apă de la robinet, apoi au fost introduse în pahare Erlenmeyer de 500 ml și s-a adăugat extractul de fermentare în raport boabe : extract = 1:3 (m/v).

Pentru a îmbunătăți procesul de fermentație al boabelor de soia, în mediul fermentativ s-a introdus zaharoză în procent de 1%, 3% și 5% (raportată cantitatea de mediu fermentativ).

Boabele au fost fermentate timp de 24, 48, 72 și 96 ore la 35°C (temperatura optimă a bacteriilor lactice heterofermentative).

După expirarea duratei de fermentare, pentru fiecare variantă de adaos de zaharoză (de 1%, 3% și 5%) s-au scos probele de boabe de soia fermentate din mediul de fermentare, s-au spălat, s-au scurs și zvântat într-un termostat la 40°C/12h. Boabele uscate au fost ulterior măcinate și păstrate sub formă de făină la 4°C până la efectuarea determinărilor. Singura determinare care s-a efectuat pe boabe de soia umede germinate și fermentate a fost analiza senzorială.

## 3.3. Metode de analiză

Calitatea nutrițională a boabelor de soia germinate și supuse apoi fermentației lactice a fost evaluată experimental prin determinarea următorilor parametri biochimici: *extractul solubil, glucidele solubile, azotul solubil și aminic; activitatea ureazică, fosforul anorganic; mineralele solubile, asimilabile ( $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ); vitamina B<sub>1</sub>; activitatea antioxidantă.*

De asemenea, a fost efectuată și o analiză senzorială a boabelor de soia prelucrate pentru a evalua, în special, caracteristicile de gust și miros care fac neplăcut consumul boabelor de leguminoase netratate termic.

### 3.3.1. Determinarea extractului solubil

*a) Principiul metodei*

În timpul germinării și a fermentației lactice are loc o activare și intensificare a activității enzimatice, motiv pentru care macromoleculele sunt hidrolizate în compuși simpli, ceea ce determină creșterea nivelului extractului solubil. Astfel, determinarea evoluției extractului solubil este o modalitate de apreciere a solubilizării compușilor macromoleculari și indirect a creșterii gradului de utilizare a compușilor nutritivi din boabele de soia prelucrate biotehnologic.

*b) Tehnica de lucru*

2 g făină din boabele de soia (martor sau prelucrate prin germinare și fermentare), cu dimensiuni ale particulelor care să treacă prin sita de 0.4mm s-au introdus într-un pahar Erlenmeyer, și s-a adăugat 30 ml apă distilată. S-a agitat și s-a lăsat apoi 8 ore pentru extracție. După expirarea timpului, s-a amestecat

intens și s-a filtrat. S-au prelevat 10 ml de filtrat într-o fiolă de cântărire (cântărită și adusă la masă constantă în prealabil) apoi s-a adus la sec pe o baie de apă. Fiola cu reziduu uscat s-a uscat în final în etuvă timp de 3 ore /105°C, după care s-a cântărit.

c) *Calcul rezultatelor:*

$$\% \text{ extract solubil} = \frac{m \cdot 30 \cdot 100}{10 \cdot 2}; \quad m = M - M_0 \quad (3.1)$$

unde: m – masa de reziduu extras cu apa și uscat la etuvă

M – masa fiolei de cântărire cu reziduu uscat, g

M<sub>0</sub> – masa fiolei de cântărire uscate, goale, g

30 – volum final de soluție, ml; 10 – volum de probă luată în lucru

2 – masa de făină luată în analiză. Rezultatele au fost raportate a 100 g făină de soia.

### 3.3.2. Determinarea pH-ului

Evaluarea pH-ului mediului fermentativ, în diferitele momente ale fermentației este necesară pentru a monitoriza activitatea bacteriilor lactice, precum și de a urmări gradul de formare a acidului lactic.

Din mediul de fermentare s-au prelevat 10 ml probă într-un pahar Berzelius și s-a determinat pH-ul cu un pH-metru (model GRYF 464, Fisher Slovakia), calibrat față de apă bidistilată.

### 3.3.3. Determinarea acidității titrabile a mediului fermentativ

a) *Principiul metodei*

Metoda se bazează pe titrarea acizilor din mediul fermentativ cu NaOH 0,1N, în prezența fenolftaleinei ca indicator, până la virajul culorii soluției spre roz.

b) *Tehnica de lucru*

S-a prelevat din mediul de fermentare 10 ml într-un pahar Erlenmeyer și apoi s-a titrat cu o soluție de NaOH 0,1N în prezența fenolftaleinei. S-a înregistrat volumul de NaOH 0,1N consumat la titrare.

c) *Calcul rezultatelor*

Aciditatea titrabilă s-a exprimat în g acid lactic / 100 ml mediu fermentativ:

$$\text{acid lactic (g / 100ml mediu fermentativ)} = \frac{V \cdot t}{10} \cdot 100 \quad (3.2)$$

unde:

V – volumul de NaOH 0,1N consumat la titrare, ml

t – titrul acidului lactic în raport cu NaOH 0,1N, g / ml

100/10 – diluția efectuată, ml.

### 3.3.4. Determinarea numărului total de bacterii lactice (Metoda culturala Koch prin inoculare în masa mediului solidificat)

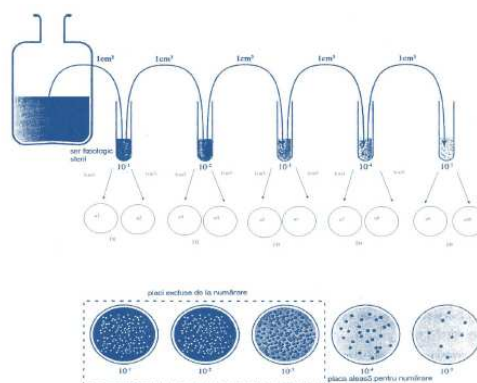
a) *Principiul metodei*

Extractul fermentativ este inoculat pe un mediu de cultură specific și după incubare sunt numărate coloniile formate.

b) *Tehnica de lucru*

S-au efectuat diluții zecimale ale mediului fermentativ lactic de abalizat în soluție salină (NaCl, 0.85% w/v) cu peptonă (0,1% w/v). 1 cm<sup>3</sup> din fiecare diluție s-a transferat cu câte o pipetă sterilă în plăci Petri sterile, iar peste suspensia din fiecare placă se repartizează câte o eprubetă cu 10-15 cm<sup>3</sup> mediu de cultură MRSA (Man Rogosa Sharpe Agar) sterilizat în prealabil la 121°C/15 minute fluidificat și temperat.

Mediul s-a omogenizat cu suspensia din placă prin mișcări orizontale, circulare ale plăcii; după solidificarea mediului, se termostatează la 30°C timp de 48 ore și s-au format colonii (acest mod de cultivare este cel mai favorabil pentru microorganismele facultativ anaerobe).



**Figura 3.1.** Modul de realizare a diluțiilor și de cultivare a extractului fermentativ lactic

### c) Citirea și interpretarea rezultatelor

După termostatarea la 30°C timp de 48 ore, s-au format coloniile. În funcție de numărul de colonii evidențiate în plăcile din care s-a făcut numărarea  $n$ , se va calcula numărul de microorganisme pe gram sau  $\text{cm}^3$  probă de analiză, cu formula:

$$N = \frac{\sum n}{x_1 + 0.1 \cdot x_2} \cdot k \quad (3.3)$$

unde:  $N$  – numărul de celule/ $\text{cm}^3$  probă;

$\sum n$  – suma numărului coloniilor din plăcile din care se face numărarea;

$x_1$  – numărul plăcilor din prima diluție aleasă pentru numărare;

$x_2$  - numărul plăcilor din a doua diluție aleasă pentru numărare;

$k$  – coeficientul de diluție corespunzător primei diluții aleasă pentru numărare;

0,1 – coeficient care egalează diluțiile.

În cazul în care numărul de colonii pe placă este mare, în imposibilitatea repetării analizei, pentru a înlesni numărarea fie se împarte placa în mai multe sectoare, se numără coloniile pe un sector și, în final, se însumează coloniile pe întreaga placă, fie se delimitează pe reversul mediului o suprafață de 1  $\text{cm}^2$ , care conține un număr mediu de microorganisme, se numără coloniile de pe această suprafață și, în final, se raportează la total suprafață mediul din placă.

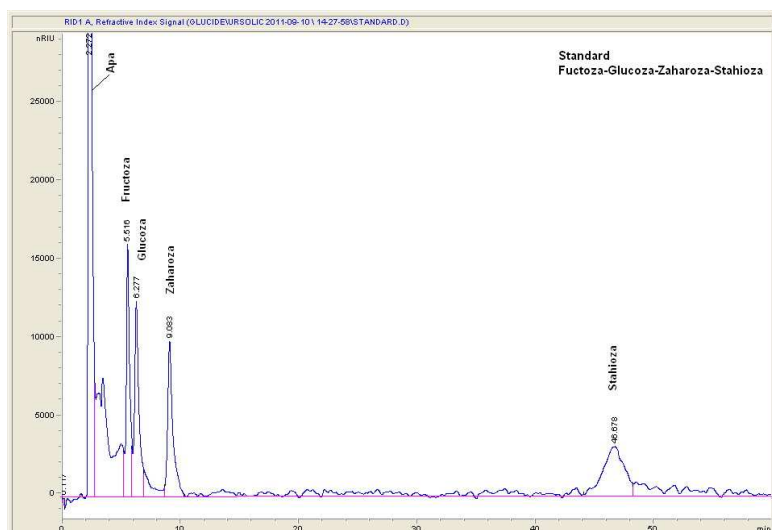
### 3.3.5. Determinarea glucidelor prin metoda HPLC

Determinarea glucidelor s-a făcut cu scopul de a investiga evoluția glucidelor prin tratamentele biotehnologice de germinare și fermentație lactică, precum și evoluția concomitentă a fructozei, glucozei și zaharozei.

Determinările au fost efectuate la Centrul de Cercetare pentru Studiul Calității Produselor Agroalimentare din cadrul Universității de Științe Agronomice și Medicină Veterinară, București.

#### b) Tehnica de lucru

Glucidele solubile (mono și oligoglucide) au fost extrase din boabele de soia printr-o procedură de extracție triplă pornind de la 2g de făină de soia germinată și fermentată în condițiile prezentate anterior, după metoda Bădulescu modificată (2003). Astfel, s-au realizat 3 extracții succesive cu câte 20 ml etanol 80%, etanol 50% și apă distilată, la 80°C timp de 15 minute. După fiecare extracție, probele au fost centrifugate într-o centrifugă tip Thermo Corporation IEC CL 30 la 4000 rot/min. (15 minute). Cele 3 fracții de supernatant au fost reunite, iar extractul final a fost evaporat la sec sub vid (liofilizat) într-un liofilizator tip Christ Beta 2-8 LD la -91°C/0,140 mbar. Fiecare extract sec s-a reluat în 2 ml de apă distilată de puritate HPLC, filtrat prin filtre cu porozitate de 0,2  $\mu\text{m}$  și apoi a fost supus analizei utilizând echipamentul HPLC Agilent 1200 Series, cuplat cu detector cu indice de refracție (RID).



**Figura 3.3.** Exemplu de cromatogramă a standardului pentru determinarea glucidelor

**Condiții HPLC:** Coloana Zorbax NH<sub>2</sub>, 250 mm x 4,6 mm, 5 μm (cod Agilent 880952-708); faza mobilă: acetonitril HPLC: apă=80:20; viteză 1,5 ml/min; volumul de injecție: 10 μl.

**Detectia:** Pe baza indicelui de refracție. Fructoza eluează între 5,3-5,8 minute, glucoza eluează între 6,3-7,2 minute, zaharoza între 9,354-10 minute, rafinoza între 20,03-24 minute și stahioza între 50-60 minute, conform cromatogramei din figura 3.3.

c) *Calculul concentrației* de glucide se realizează utilizând o curbă etalon pentru pe domeniul de concentrație 0-10 mg/ml, iar rezultatele se exprimă în g/100g s.u.

Exemplu raport de cromatografie pentru un etalon-amestec de glucoză, fructoză, zaharoză, stahioză, rafinoză de concentrație 5 mg/ml.

### 3.3.6. Determinarea compușilor cu azot

Compușii cu azot investigați în această lucrare sunt azotul solubil (neproteic) și azotul aminic ca indicatori care evaluează gradul de hidroliză a proteinelor din bobul de soia.

Azotul solubil reprezintă azotul neproteic existent în peptide și polipeptide și se determină după precipitarea proteinelor și separarea lor.

Azotul aminic este un indicator care evaluează gradul de hidroliză a proteinelor prin determinarea nivelului total de aminoacizi.

#### 3.3.6.1. Determinarea azotului solubil (neproteic)

##### a) Principiul metodei

Pentru determinarea azotului neproteic s-au separat proteinele de alte combinații prin precipitare cu acid tricloracetic, iar precipitatul a fost mineralizat cu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat, în prezență de catalizatori și s-a determinat conținutul de azot proteic după metoda Kjeldahl.

Filtratul rezultat după precipitarea proteinelor a fost investigat sub aspectul determinării azotului neproteic (solubil), urmând ca protocol de lucru tot metoda Kjeldahl.

b) *Reactivi:* acid tricloracetic 50%; acid tricloracetic 2%; reactivii utilizați la metoda Kjeldahl.

c) *Tehnica de lucru:* s-au mărunțit fin 5 g boabe de soia fin cu o râșniță electrică Phillips (până la o granulație de 0,4 mm), s-au introdus într-un pahar de 100 ml, s-au adăugat 25 ml apă distilată și s-a încălzit amestecul până la fierbere, agitând conținutul paharului cu o baghetă de sticlă. Apoi s-au precipitat proteinele cu soluția de acid tricloracetic. S-au adăugat 5 ml soluție de acid tricloracetic 50% peste probă, s-a lăsat în repaus timp de 30-40 minute apoi conținutul s-a filtrat prin hârtia de filtru cantitativă; paharul și precipitatul de pe filtru s-a spălat de câteva ori cu soluție de acid tricloracetic 2%. După filtrare, filtratul s-a uscat 2 ore la termostat la 50-60°C, s-a introdus într-un balon Kjeldahl, peste care s-au adăugat 5 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat și 1 g de amestec catalizator (format din K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> și CuSO<sub>4</sub> 3:1), apoi s-a mineralizat.

S-a determinat nivelul azotului neproteic urmând protocolul descris de metoda Kjeldahl.

*Reactivi:* acid sulfuric  $d=1,84$ ; acid sulfuric 0,1 N; hidroxid de sodiu 0,1 N; hidroxid de sodiu 33%; sulfat de cupru - pulbere; sulfat de sodiu - pulbere; indicator roșu de Congo sau alt indicator.

d) *Calculul azotului neproteic* se face cu relația:

$$\text{azot, g/100ml filtrat} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,014}{V} \cdot d \cdot 100, \quad (3.4.)$$

în care:

$V_1$  – ml  $H_2SO_4$  0,1 N adăugați inițial;

$V_2$  – ml de NaOH 0,1 N cu care se titrează excesul de  $H_2SO_4$  0,1N;

0,0014 – titrul  $H_2SO_4$  0,1 N, în g/ml.

V – volumul de filtrat luat pentru analiză, în ml;

d – diluțiile efectuate

### 3.3.6.2. Determinarea azotului aminic (metoda cu formaldehidă)

a) *Principiul metodei*

În soluții neutre de aminoacizi, grupările aminice ale acestora ( $-NH_2$ ) sunt blocate cu formol formându-se metilen-derivați cu reacție acidă care se determină prin titrare cu hidroxid de sodiu.

b) *Reactivi:* formol, soluție 40% (neutralizată în prezența fenolftaleinei); hidroxid de sodiu, soluție 0,01 N; fenolftaleină, soluție alcoolică 1%

c) *Tehnica de lucru*

Se cântăresc 10 g produs de analizat, se mojarază cu 20 ml apă distilată  $40^\circ C$  și se duce cantitativ într-un cilindru gradat de 100 ml. Se aduce la volum de 100 ml cu apă distilată, se omogenizează bine și se lasă timp de 10 minute pentru extracție, omogenizând de câteva ori în acest interval. Proba astfel pregătită, se filtrează printr-un filtru cutat și uscat într-un balon Erlenmeyer curat și uscat. Din filtratul obținut se iau 20 ml într-un balon Erlenmeyer, se neutralizează cu NaOH 0,1 n în prezența fenolftaleinei până la slab roz; se adaugă apoi 10 ml formol 40% și se titrează cu NaOH 0,1 n până la slab roz.

d) *Calculul rezultatelor*

Cantitatea de aminoacizi din proba analizată se exprimă în procente de azot sau de glicocol, după relația:

$$\% \text{azot aminic (glicocol)} = \frac{V \cdot t}{m} \cdot 100 \cdot d \quad (3.5)$$

unde: t – titrul soluției de NaOH 0,1N, în azot sau glicocol ( $E_{\text{glicocol}} = 75$ ;  $E_{\text{azot}} = 14$ ), g/ml;

V – volumul de NaOH 0,01N utilizat la titrarea probei după ce s-a adăugat formolul, ml;

m – masa de produs analizată, în g;

d – diluția cu care s-a lucrat.

Rezultatul final s-a exprimat în g azot / 100 g s.u.

### 3.3.7. Determinarea inhibitorului tripsinic

a) *Principiul metodei*

Determinarea activității reziduale a urezei în boabele de soia este utilizată ca indicator pentru prelucrarea corespunzătoare a boabelor de soia, din punct de vedere al inactivării factorilor antinutriționali; cu cât activitatea ureazică este mai mare, cu atât nivelul factorilor antinutritivi, respectiv a inhibitorului tripsinic este mai mare.

Deoarece ureaza catalizează descompunerea ureei în amoniac și dioxid de carbon, activitatea ureazică a fost estimată prin cantitatea de azot amoniacal eliberată de 1g de produs per minut, la  $30^\circ C$ .

b) *Reactivi:* acid clorhidric 0,1 N, soluție de hidroxid de sodiu 0,1 N, soluție tampon de fosfați (se dizolva 4,45g fosfat disodic,  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  și 3,40g fosfat monopotasic,  $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  în apă și se completează cu apă la 1000ml), soluție de uree cu pH 6,9-7,0 (se dizolvă 30g uree în 1000 ml soluție tampon de fosfat).

c) *Aparatură:* pH-metru de înaltă sensibilitate ( $\pm 0,02$ ) cu agitator magnetic; baie de apă echipată cu termostat stabilit la exact  $30^{\circ}\text{C}$ ; eprubete de  $150 \times 18 \text{ mm}$  cu dop șlefuit; sita cu dimensiunea ochiurilor de  $0,2 \text{ mm}$ ; moara de laborator, ușor de curățat și care permite măcinarea fără a provoca încălzirea produsului

d) *Mod de lucru:*  $0,2 \text{ g}$  din boabe de soia mărunțite la o finețe de  $0,2 \text{ mm}$  s-au introdus într-un balon cu dop rodat și s-au adăugat  $10 \text{ ml}$  de soluție de uree. După acoperirea imediată a balonului, acesta s-a agitat intens și s-a introdus într-o baie de apă, cu menținere la  $30^{\circ}\text{C}$  și agitare continuă timp de  $30$  minute. Imediat după expirarea timpului s-au adăugat  $10 \text{ ml}$   $\text{HCl}$   $0,1 \text{ N}$ , s-a răcit rapid la  $20^{\circ}\text{C}$  și s-a transvazat cantitativ conținutul într-un balon de titrare, clătindu-se de două ori cu  $5 \text{ ml}$  de apă. S-a titrat imediat cu soluție de hidroxid de sodiu  $0,1 \text{ N}$  până la  $\text{pH}$   $4,7$ .

În paralel s-a efectuat o probă martor: s-au introdus  $0,2 \text{ g}$  făină de soia ( $0,2 \text{ mm}$ ) într-un balon cu dop rodat de sticlă, s-au adăugat  $10 \text{ ml}$  de acid clorhidric  $0,1 \text{ N}$ ,  $10 \text{ ml}$  soluție de uree, s-a răcit imediat în apă cu gheață și s-a lăsat  $30$  de minute în repaus. S-a adus la  $20^{\circ}\text{C}$ , s-a transferat cantitativ într-un Erlenmeyer și s-a titrat imediat cu  $\text{NaOH}$   $0,1 \text{ N}$  până la  $\text{pH}$   $4,7$ .

Activitatea ureazică s-a calculat cu formula:

$$\text{activitatea ureazica} = \frac{1,4 \cdot (V_1 - V_2)}{30 \cdot E} \text{ g N / g proba} \cdot \text{min} \cdot 30\text{C} \quad (3.6.)$$

unde:  $V_2$  = volumul soluției de hidroxid de sodiu  $0,1 \text{ n}$  folosit la titrarea probei de analizat,  $\text{ml}$ ;

$V_1$  = volumul soluției de hidroxid de sodiu  $0,1 \text{ N}$  folosit la titrarea probei martor,  $\text{ml}$ ;

$1,4$  = cantitatea de azot corespunzătoare unui  $\text{ml}$ , hidroxid de sodiu  $0,1 \text{ N}$ ;

$30$  – durata de hidroliză, minute.

### 3.3.8. Determinarea sărurilor minerale asimilabile

Soia este o bună sursă de minerale, dar biodisponibilitatea acestora este redusă datorită blocării lor în complexe cu acidul fitic, iar organismul uman nu le poate utiliza deoarece nu dispune în tracol gastrointestinal de fitază, enzima care hidrolizează acești complecși.

Prin germinare și fermentare se activează fitaza, crește gradul de hidroliză a fitaților, ceea ce duce la mărirea nivelului mineralelor biodisponibile, pe care organismul le poate utiliza în metabolism.

#### 3.3.8.1. Determinarea fosforului anorganic

##### a) *Considerații generale*

Acidul fitic reprezintă principala rezervă de fosfor a plantei; el este un puternic agent de chelare, încărcat pozitiv, se leagă ușor de minerale și proteine determinând reducerea biodisponibilității acestora pentru organismul uman. Germinarea și fermentația lactică determină hidroliza fitaților din boabele de soia, ceea ce conduce la acumularea de fosfor anorganic, cei doi parametri fiind invers proporțional corelați (Chitra, 1993 . Duhan, 2002, Sinha, 2003)

b) *Principiu:* Metoda se bazează pe proprietatea pe care o are ionul fosfat de a forma cu acidul molibdenic în prezența unui reductor, un complex de culoare albastră.

c) *Reactivi:* Hidrochinonă  $1\%$ ; Sulfid de sodiu  $20\%$ ; Acid tricloracetic  $10\%$ ; Molibdat de amoniu  $2,5\%$ ; Soluție etalon de fosfat:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  p.a. s-a uscat câteva zile în exicator, s-au cântărit  $4,3866 \text{ g}$ , s-au dizolvat în puțină apă, s-a adus la semn în balon cotat de  $1000 \text{ ml}$  cu apă distilată; peste această soluție s-au adăugat câteva picături de cloroform (conservant) - soluție conține  $1 \text{ mg}$  fosfor /  $1 \text{ ml}$ .

##### d) *Modul de lucru*

S-a făcut un extract apos  $5\%$  din proba cu agitare periodică timp de  $25-30$  minute, s-a centrifugat și din supernatant s-au luat câte  $5 \text{ ml}$  în două pahare Erlenmeyer și s-a dozat cantitatea de fosfor anorganic: în fiecare pahar s-a adăugat, în ordine,  $1 \text{ ml}$  molibdat de amoniu,  $1 \text{ ml}$  sulfid de sodiu,  $1 \text{ ml}$  hidrochinonă și  $2 \text{ ml}$  apă bidistilată. După  $20$  de minute de repaus s-a citit extincția probei față de martor la  $\lambda = 610 \text{ nm}$ .

e) *Calcul rezultatelor* s-a făcut prin citirea extincției probelor pe o curbă de etalonare realizată astfel: S-a diluat  $50$  de ori soluția etalon, astfel încât  $1 \text{ ml}$  soluție conține  $20 \mu\text{g}$  fosfor. S-au pipetat într-o serie de eprubete câte  $0,5$ ;  $1$ ;  $2$ ;  $3$ ;  $4$  și  $5 \text{ ml}$  din această soluție standard, iar fiecărei probe i s-a adăugat apă până la  $10 \text{ ml}$ . După amestecare, s-au prelevat câte  $5 \text{ ml}$  într-o altă eprubetă, după care s-au adăugat  $2 \text{ ml}$

molibdat de amoniu 2,5%, 1 ml hidrocchinonă și 2 ml sulfid de sodiu. După 5 minute s-a citit extincția și s-a reprezentat grafic luând pe ordonată extincția la  $\lambda=610$  nm în cuvă de 1 cm, iar pe abscisă cantitatea de fosfor în  $\mu\text{g}$  (adică 5, 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{g}$ ) respectiv concentrația.

Rezultatele s-au exprimat în **mg fosfor la 100 g s.u.**

### 3.3.8.2. Determinarea ionilor metalici

Metoda de determinare a presupus două etape de lucru: pregătirea probei și dozarea elementelor minerale prin spectrofotometrie de absorbție atomică.

**a) Pregătirea probei:** La analiza probelor de alimente, datorită compușilor organici conținuți în probă, pentru determinarea conținutului de metale este necesară pre-tratarea probei (mineralizare, extracție) înainte de dozarea prin spectrofotometrie AAS.

Metalele biodisponibile s-au determinat prin gradul lor de extractibilitate într-o soluție de HCl 0,03M (concentrație similară cu cea din stomac) (Yagoub, 2008).

**Tehnica de lucru:** 1 g boabe de soia au fost mărunțite astfel încât să treacă prin sita cu diametrul de 0,4mm și s-au adăugat apoi 10 ml soluție de HCl 0,03N; s-a menținut pe baie de apă la 37°C timp de 3 ore sub agitare continuă. După extracția în HCl, s-a filtrat prin filtru Whatman 42, s-a uscat la etuvă la 100°C timp de 1 oră și apoi s-au calcinat 4 ore la 550°C. Probele calcinate au fost răcite și solubilizate în 2 ml HCl 6N, după care au fost încălzite lent pe baie de nisip timp de 10 minute. După răcire, probele au fost diluate la 100 ml cu apă dublu distilată, iar elementele minerale determinate apoi prin spectrofotometrie de absorbție atomică utilizând un spectrofotometru de absorbție atomică (FAAS) „Analyst 400” – Perkin Elmer.

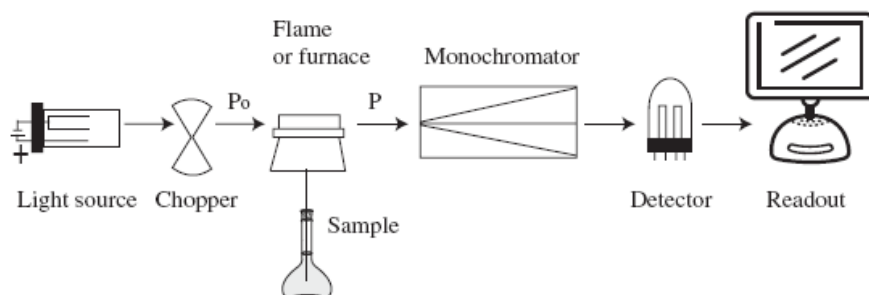
### b) Analiza metalelor prin AAS

Din soluția probei mineralizate s-au determinat metalele: zinc, fier, calciu și magneziu, prin spectrofotometrie de absorbție atomică (concentrația ionului de analizat fiind în concentrații de ordinul ppm.), folosind echipamentul „Analyst 400” – Perkin Elmer.



**Figura 3.5.** Spectrometrul cu absorbție atomică (FAAS) „Analyst 400” –Perkin Elmer.

Într-un sistem cu flacără, nebulizatorul și atomizatorul au rol determinant: nebulizatorul să aspire un eșantion lichid la cu un debit controlat, de a crea un aerosol fin și de a amesteca aerosolul cu gazul oxidant. Prin atomizare în flacără se distruge orice complex și ionii de analitici sunt transformați în atomi ai elementului de interes (forma elementară) sub forma de vapori, cum ar fi:  $\text{Ca}^0$ ,  $\text{Mg}^0$ ,  $\text{Fe}^0$  și  $\text{Zn}^0$ .



**Figura 3.6.** Elementele componente ale spectrofotometrului F-AAS cu monofascicul





**Figura 3.7.** Sursa luminoasă: lămpi monoelement pentru fiecare element de interes: HCL (hollow cathode lamp) Ca, Mg și Fe; EDL (electrodeless discharge lamp) pentru Zn.

Lungimile de undă recomandate pentru elementele determinate sunt:

Fe = 248,3 nm; Zn = 213,9 nm; Ca = 422,7nm; Mg =282.5 nm.

Absorbanța fiecărui element se măsoară în condițiile standard recomandate (lungime de undă, dimensiuni optime ale fantei (lățime, înălțime), zgomot relativ, concentrație caracteristică, concentrație caracteristică corectată, zona de liniaritate aproximată).

Concentrația analitului corespunzătoare acestei absorbanțe s-a determinat apoi, pentru fiecare element, cu ajutorul curbei de etalonare: absorbanță = f (concentrație), realizată cu ajutorul soluțiilor de etalonare respective. Mai jos sunt prezentate curbele de etalonare utilizate pentru calibrarea aparatului, pentru toate cele 4 elemente.

c) *Exprimarea rezultatelor* au fost stabilite de soft-ul aparatului și au avut la bază curba de calibrare.

Concentrația caracteristică, repetabilitatea metodei și limita de detecție se pot calcula pe baza datelor din soft-ul aparatului.

Rezultatele finale au fost exprimate în ppm. (mg metal/ kg produs) și raportate la 100 g substanță uscată.

Extractibilitatea se determină prin raportarea cantității de minerale extrase în HCl 0,03N la cantitatea totală a lor.

### 3.3.9. Determinarea vitaminei B<sub>1</sub> prin HPLC

Determinarea vitaminelor s-a făcut în două etape: extracția și analiza HPLC propriu-zisă.

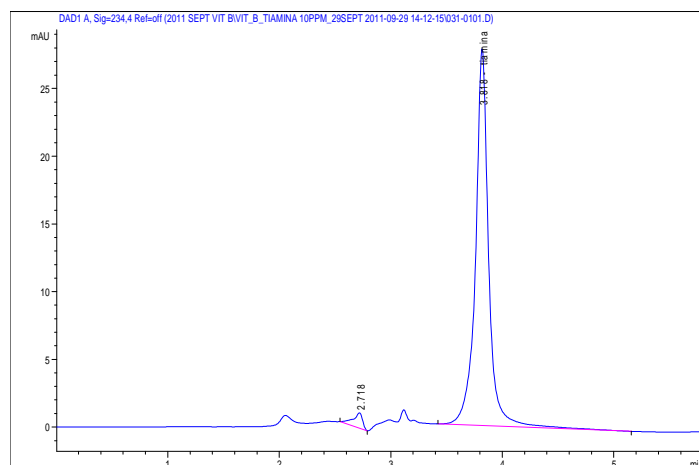
#### a) Principiul metodei

Procedura de extracție a vitaminelor B din probele analizate se bazează pe combinarea hidrolizei acide cu cea enzimatică.

#### b) Tehnica de lucru

Se cântăresc 5 g de proba într-un pahar Berzelius, peste care se adaugă 60 ml HCl 0,1N care apoi se autoclavează la temperatura de 121°C timp de 30 minute. După răcire se ajustează pH-ul la 4.0 cu acetat de sodiu 2M și se adaugă circa 500 mg takadiastază. Probele se vor lăsa 18 ore la 37°C pentru realizarea digestiei enzimatică.

După răcire probele se aduc la balon cotat de 100 ml și apoi se filtrează. Extractele filtrate au fost păstrate în frigider la 4°C până în momentul determinării prin HPLC.



**Figura 3.12.** Exemplu de cromatogramă pentru standardul de tiamină

**Condiții HPLC:** tip Agilent 1200 Series, coloana cromatografică cu fază inversă: Ascentis C18 (25 cm x 4,6mm, 5µm); FM: A – tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH=7,0 B – Metanol; viteza 1,5 ml/min; volumul de injectare-10µL.

Configurație: degazor, pompa cuaternară pentru gradient de concentrație, autosampler, compartiment termostatare coloană cromatografică (termostatare la 25°C), detector cu şir de diode DAD cu lungime de undă programabilă și detector cu fluorescență.

**Condiții de determinare HPLC-DAD-FLD:** Lungimile de undă DAD: 234nm, 324nm, 282 nm (caracteristice pentru tiamina, piridoxină și respectiv acid folic); pentru determinarea riboflavinei s-a lucrat pe detectorul de fluorescență cu excitație 453 nm și emisie la 521 nm.

Un exemplu de cromatogramă pentru standardul de tiamină este redat în figura 3.12.

Calculul concentrației de vitamine se face utilizând o curbă etalon pentru domeniul de concentrație de 0-10mg/ml, iar rezultatele se exprimă în mg/100 g s.u.

### 3.3.10. Determinarea activității antioxidante - metoda cu o-fenantrolină

#### a) Principiul metodei

Metoda se bazează pe capacitatea antioxidantilor de a reduce ionul  $\text{Fe}^{3+}$  la  $\text{Fe}^{2+}$  și reacția acestora cu o-fenantrolina cu apariția unui compus colorat în roșu.

b) *Reactivii* necesari sunt: alaun feriamoniacal  $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , soluție alcoolică 0,2%; sare Mohr  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , pentru scara etalon; clorhidrat de hidroxilamină, 10%; acetat de sodiu, 10%; o-fenantrolină, soluție alcoolică 0,15%; alcool etilic 90°; acid clorhidric, d=1,19;

#### b) Mod de lucru

Pentru efectuarea determinărilor s-a stabilit mai întâi o *scară etalon*: s-au cântărit cu precizie 0,7022 g sare Mohr, s-a dizolvat în puțină apă distilată, s-a trecut într-un balon de 1000 mL. Sau adăugat adaugă 20 ml HCl (1:1), s-a adus la semn cu apă distilată și s-a omogenizat (1 ml din această soluție conține 0,1 mg  $\text{Fe}^{2+}$ ).

Din soluția etalon s-au pipetat în baloane cotate de 25m câte: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0, 1,1, 1,2 ml peste care s-a adăugat 1 ml clorhidrat de hidroxilamină, 5 ml acetat de sodiu, 5 ml o-fenantrolină și s-a adus totul la semn cu alcool etilic și apoi se omogenizează bine. În paralel s-a efectuat o probă martor în aceleași condiții, dar fără soluția etalon. Toate probele au fost menținute o oră la întuneric apoi li s-a măsurat extincția la 510 nm, prin cuve de 1 cm, folosind ca fond proba martor. S-a trasat curba etalon trecând pe abscisă cantitatea de  $\text{Fe}^{2+}$  și pe ordonată extincția corespunzătoare.

Extractele hidroalcoolice de soia prelucrată biotehnologic (germinată și fermentată) au fost obținute după o metoda descrisă de Rashad ș.a. (2011), modificată: 5 g boabe de soia au fost măcinate astfel încât să treacă prin sita de 0,4mm, apoi extrase cu 25 ml metanol și menținute sub amestecare continuă la 100 rot/min timp de 2 ore/ 55°C. După expirarea timpului, soluția a fost filtrată prin filtru Whatman nr. 1 și filtratele au fost concentrate în liofilizator (Christ Beta 2-8 LD la -86°C/ 0.160 mbari), până la un volum de 2 ml. Acest volum de 2 ml s-a pipetat într-un balon cotat de 25 ml, s-au adăugat 5 ml alaun feriamoniacal, 5 ml acetat de sodiu și 5 ml o-fenantrolină, s-a omogenizat bine.

În paralel s-a efectuat o probă martor, fără alaun feriamoniacal. Ambele probe au fost menținute la întuneric timp de o oră, după care li s-a citit extincția față de martor, în cuve de 1 cm, la 510 nm. Cu ajutorul curbei etalon trasate (figura 3.14) s-a determinat cantitatea de  $\text{Fe}^{2+}$  formată prin acțiunea antioxidantului prezent.

*Calcul.* Activitatea antioxidantă se exprimă în **mg  $\text{Fe}^{2+}$  la 1g boabe de soia prelucrate.**

### 3.3.11. Analiza senzorială

Evaluarea senzorială a boabelor de soia prelucrate biotehnologic a fost condusă prin analiza descriptivă și testare afectivă utilizând metoda scării hedonice de opt puncte.

Evaluarea senzorială prin utilizarea *scării hedonice* s-a făcut parcurgând etapele:

1. *Selectarea evaluatorilor*

3. *Pregătirea fișei de degustare*

2. *Pregătirea probelor*

4. *Realizarea degustării*

**Tabel 3.2.** Fișa de apreciere pentru gustul boabelor de soia prelucrate biotehnologic

| <b>APRECIEREA GUSTULUI PROBELOR</b> |  |
|-------------------------------------|--|
| Fișa de degustare nr. ....          |  |
| Data degustării:                    |  |
| Informații despre degustător:       | Nume:  |
|                                     | Prenume:   |
|                                     | Vârsta:  |
| Indicații de degustare:             | Se va acorda pentru fiecare probă în parte punctajul care corespunde aprecierii făcute de dumneavoastră cu privire la gustul probelor analizate. |

| Aprecieri hedonice | Îmi place extrem de mult | Îmi place foarte mult | Îmi place moderat | Îmi place puțin | Îmi displace puțin | Îmi displace moderat | Îmi displace foarte mult | Îmi displace extrem de mult | Observații<br>Comentarii |
|--------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------|-----------------|--------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Punctaj            | 8 puncte                 | 7 puncte              | 6 puncte          | 5 puncte        | 4 puncte           | 3 puncte             | 2 puncte                 | 1 punct                     |                          |
| PROBA              |                          |                       |                   |                 |                    |                      |                          |                             |                          |
| 1...13             |                          |                       |                   |                 |                    |                      |                          |                             |                          |

#### 5. Interpretarea statistică a datelor obținute.

Pentru toate datele cantitative s-au calculat valorile statistice standard: media, deviația standard și varianța.

Rezultatele evaluării fiecărui atribut în parte au fost cuantificate prin reprezentarea valorilor punctajelor medii obținute pentru fiecare atribut în parte în grafice tip păianjen sau radar. Apoi interpretările au fost făcute în funcție de durata de fermentare, dar și de cantitatea de zaharoză cu care a fost suplimentat mediul fermentativ.

### 3.5. Rezultate și discuții

Calitatea nutrițională a boabelor de soia neprelucrate, germinate timp de 4 zile la 25°C și fermentate lactic cu 1, 3, 5% zaharoză într-un mediu fermentativ lactic timp de 24, 48, 72 și 96 ore, a fost evaluată prin determinarea experimentală a unor parametri biochimici.

#### 3.5.1. Influența procesării biotehnologice asupra compoziției boabelor de soia

##### 3.5.1.1. Extractul solubil

În timpul germinării și a fermentației lactice are loc o activare și intensificare a activității enzimaticе, motiv pentru care macromoleculele sunt hidrolizate în compuși simpli, ceea ce determină creșterea nivelului extractului solubil.

În lucrarea de față s-a determinat extractul solubil al boabelor de soia germinate timp de 4 zile la 25°C și fermentate 24, 48, 72 și 96 ore în condițiile unui adaos suplimentar de zaharoză în mediul fermentativ de 1, 3 sau 5%.

Rezultatele sunt redade în tabelul 3.4 și grafic în funcție de durata de fermentare, cât și de adaosul de zaharoză în mediul de fermentare.

**Tabelul 3.4.** Variația extractului solubil al boabelor cu durată de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată în mediu\*

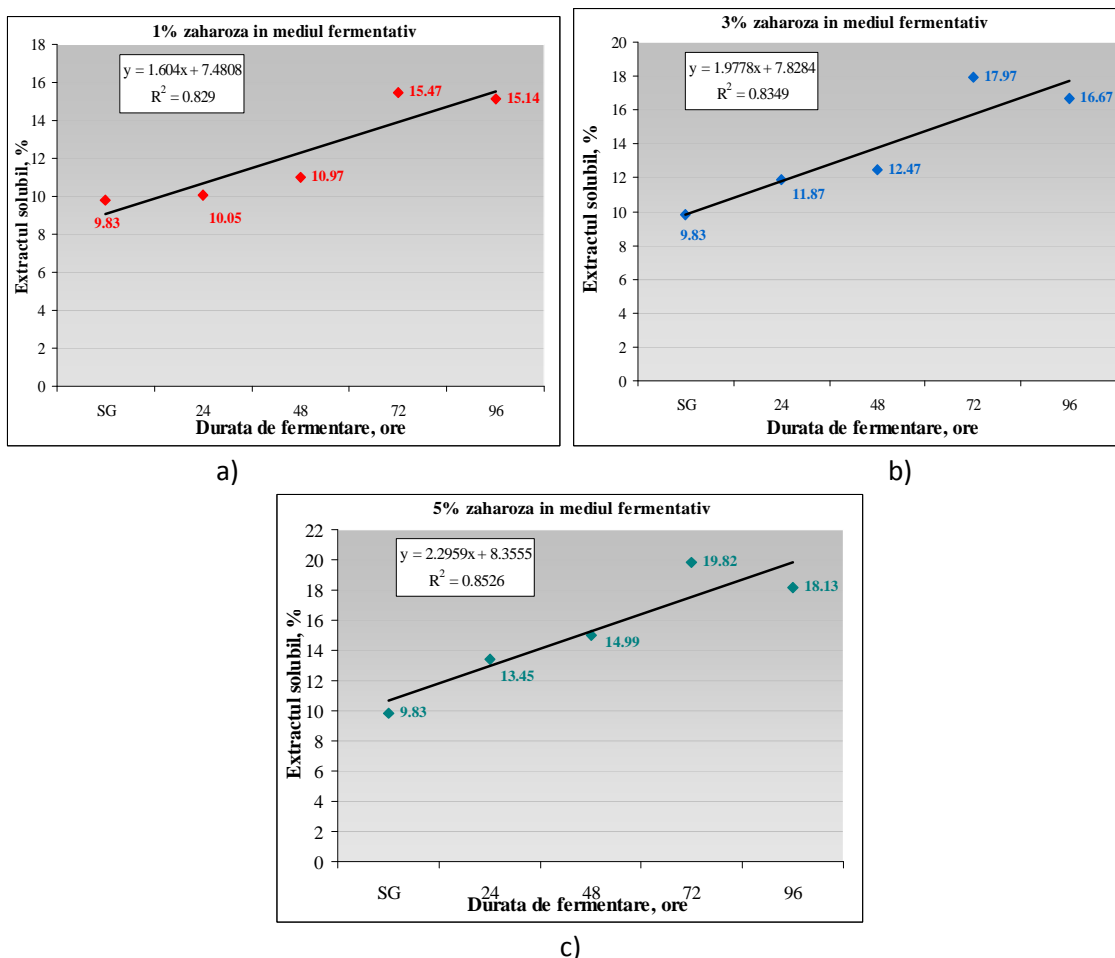
| Durata de prelucrare | Extractul solubil, % |                                      |              |              |
|----------------------|----------------------|--------------------------------------|--------------|--------------|
|                      | Soia germinată       | Soia fermentată                      |              |              |
|                      |                      | Concentrația de zaharoză în mediu, % |              |              |
|                      |                      | 1                                    | 3            | 5            |
| 4 zile               | 9,83±0.049           | -                                    | -            | -            |
| 24 ore               | -                    | 10,050±0,064                         | 11,87±0,049  | 13,45±0,016  |
| 48 ore               | -                    | 10,97±0,053                          | 12,471±0,048 | 14,989±0,055 |
| 72 ore               | -                    | 15,471±0,057                         | 17,971±0,059 | 19,826±0,047 |
| 96 ore               | -                    | 15,14±0,053                          | 16,67±0,062  | 18,131±0,06  |

\* Valorile reprezintă media a trei determinări ± devierea standard

În figura 3.15 se poate observa că nivelul extractului solubil pentru toate duratele de fermentare crește cu cantitatea de zaharoză adăugată. Astfel, după fermentarea boabelor de soia timp 24 de ore în prezența unui aport suplimentar de zaharoză de 1%, extractul solubil al acestora crește cu 2,24% față de soia germinată (SG) pentru a ajunge după 96 ore cu 54,01% superior matorului germinat.

Aceeași tendință crescătoare se poate observa și pentru boabele de soia fermentate cu 3 și respectiv 5%, când nivelul maxim al extractului solubil crește cu 82,82% (pentru probele cu 3% zaharoză în mediul fermentativ) și respectiv cu 101,69% (pentru 5% zaharoză) comparativ cu boabele de soia supuse numai germinării (figura 3.15 a, b, c), valori calculate după 72 ore, ca valori maxime.

După analiza semnificației și a ecuațiilor de regresie a extractului solubil cu cantitatea de zaharoză adăugată în mediul fermentativ, coeficientul de corelație  $R^2$  (pătratul coeficientului Pearson) este mai mare decât 0,83, ceea ce arată că modelele sunt bine definite la un prag de semnificație de 5% ( $p < 0,5$ ).

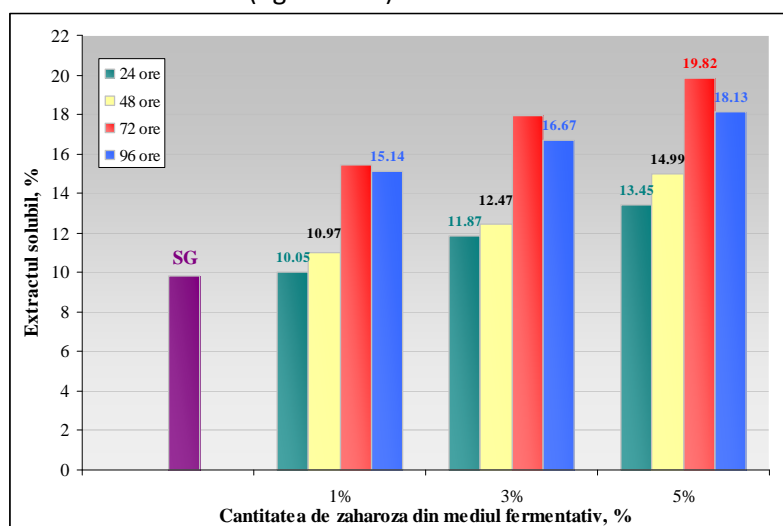


**Figura 3.15.** Evoluția extractului solubil cu durată de fermentare și zaharoză adăugată: a) 1%, b) 3% c) 5%

Valorile extractului solubil au atins maximul pentru probele fermentate în mediu cu 5% zaharoză adăugată suplimentar pentru toate duratele de fermentare (figura 3.16). Astfel, extractul solubil a atins valoarea de 13,45% (după 24 ore), 14,99% (după 48 ore), 19,82% după 72 ore și respectiv 18,13% după 96 ore de fermentare.

Această evoluție se poate explica pe de o parte prin faptul că mediul a fost suplimentat cu un nivel mai mare de zaharoză (5% comparativ cu 3 și 1%), dar și datorită proceselor mai intense de hidroliză datorate unei activități mai intense a lactobacililor la această concentrație suplimentară de zaharoză (vezi subcapitolul 3.5.1.3).

De asemenea, se poate observa că după 96 ore de fermentare, nivelul extractului solubil este mai mic decât cel determinat în probele fermentate timp de 72 ore, evoluție înregistrată pentru toate variantele de adaos de zaharoză în mediul de fermentare (figura 3.16).



**Figura 3.16.** Evoluția cantității de extract solubil cu concentrația de zaharoză adăugată în mediul fermentativ

Explicația acestei evoluții ar putea fi corelată cu consumul factorilor nutritivi, (substanțele simple solubile din boabele de soia), de către bacteriile lactice în procesul fermentativ, consum foarte intens în ultimele perioade de prelucrare (vezi evoluția numărului de lactobacili).

Boabele de soia germinate și fermentate timp de 72 ore cu 3% adaos suplimentar de zaharoză au înregistrat o creștere procentuală de 82,81% a nivelului extractului solubil, comparativ cu probele germinate, iar în cele cu 1% zaharoză suplimentară s-a determinat o valoare a extractului solubil cu 57,38% mai mare decât a boabelor supuse doar germinării.

**De aici se poate concluziona că prin germinarea urmată de fermentare lactică timp de 72 ore cu 5% zaharoză se înregistrează creșterea cea mai mare a valorii extractului solubil, până la 28,12% (comparativ cu boabele de soia germinate).**

### 3.5.1.2. pH-ul și aciditatea titrabilă

pH-ul și aciditatea titrabilă sunt parametri importanți pentru descrierea proceselor ce au loc la prelucrarea biotehnologică a boabelor de soia prin germinare și fermentare lactică. Astfel, se poate observa evoluția procesului fermentativ prin formare de acid lactic, prin scăderea pH-ului și în același timp, de corelare a caracteristicilor biochimice-nutriționale și senzoriale cu nivelul acidității titrabile.

Valorile pH-ului extractelor de grâu în care a avut loc fermentarea sunt redată în tabelul 3.5, dar și grafic, în figura 3.21.

**Tabelul 3.5.** Variația pH-ului mediului de fermentare cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

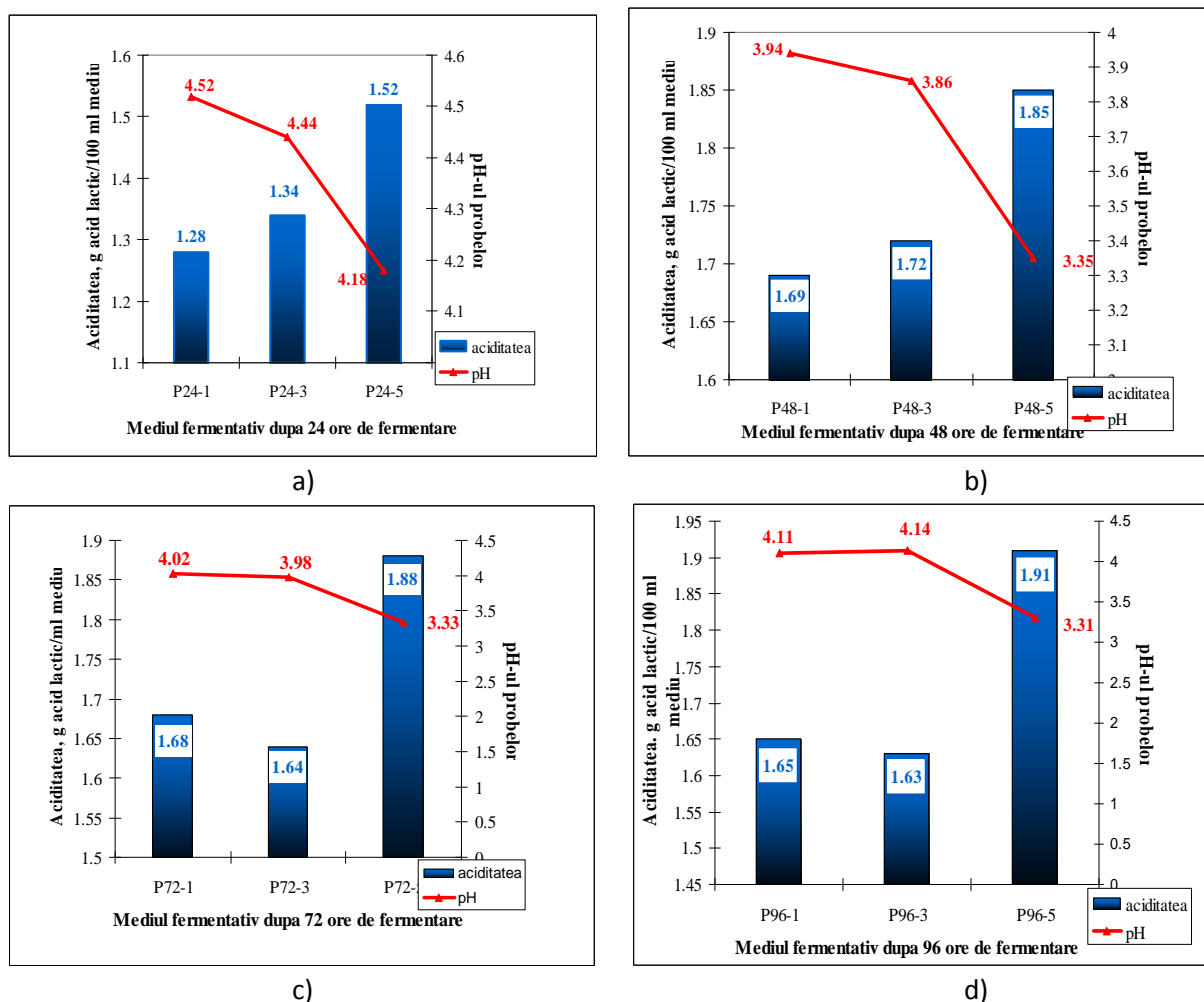
| Durata de fermentare, ore | pH-ul       |             |             |
|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                           | 1% zaharoză | 3% zaharoză | 5% zaharoză |
| 24                        | 4,52±0,021  | 4,44±0,03   | 4,18±0,047  |
| 48                        | 3,94±0,538  | 3,86±0,053  | 3,35±0,059  |
| 72                        | 4,02±0,059  | 3,98±0,045  | 3,33±0,036  |
| 96                        | 4,11±0,039  | 4,14±0,046  | 3,31±0,056  |

\* Valorile reprezintă media a trei determinări ± devierea standard

În figura 3.21 este redată evoluția pH-ului și a acidității cu durata de prelucrare, în funcție de cantitatea de zaharoză adăugată în mediul fermentativ.

Astfel, se poate constata că după 24 de ore de fermentare valoarea pH-ului mediului fermentativ cu adaos de 5% zaharoză la 4,18, scădere care reprezintă față de mediul cu adaos de zaharoză 1% un procent de 7,52%

Scăderea semnificativă a pH-ului se înregistrează până la 72 ore de fermentare, pentru ca apoi să fie nesemnificativă.



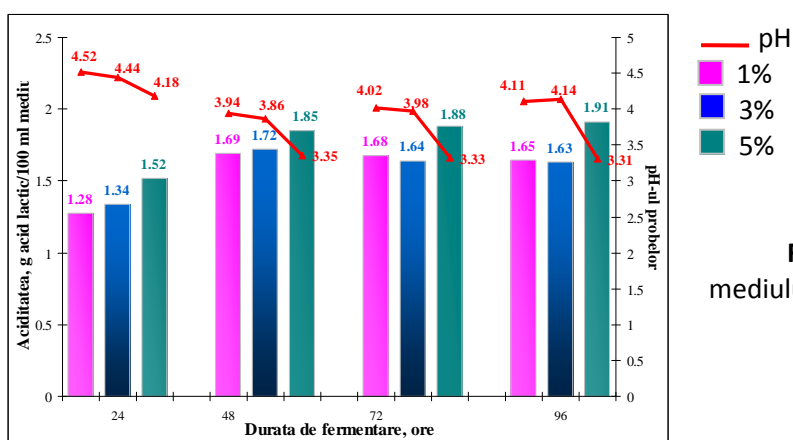
**Figura 3.21.** Evoluția pH-ului și a acidității mediului de fermentare cu timpul de fermentare: a) 24 ore; b) 48 ore; c) 72 ore; d) 96 ore.

**Tabelul 3.6.** Variația acidității totale a mediului de fermentare cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

| Durata de fermentare, ore | Aciditatea, g acid lactic / 100 ml mediu fermentativ |             |             |
|---------------------------|--|-------------|-------------|
|                           | 1% zaharoză  | 3% zaharoză | 5% zaharoză |
| 24                        | 1,28±0,040   | 1,34±0,0042 | 1,52±0,050  |
| 48                        | 1,69±0,063   | 1,72±0,053  | 1,85±0,059  |
| 72                        | 1,68±0,059   | 1,64±0,045  | 1,88±0,036  |
| 96                        | 1,65±0,039   | 1,63±0,046  | 1,91±0,056  |

\*Valorile reprezintă media a trei determinări ± devierea standard

Cea mai mare valoare a acidității s-a înregistrat la probele fermentate 72 și 96 ore, cu un adaos de 5% zaharoză, când nivelul acidului lactic, ca echivalent, a ajuns la 1,88 g/100 g ml și respectiv 1,91 g/100 ml mediu fermentativ (figura 3.21, c și d). Se constată, de asemenea o creștere semnificativă a acidității între probele fermentate cu 3% zaharoză și cele cu 5% zaharoză pentru toate duratele de fermentare.



**Figura 3.22.** Evoluția pH-ului și a acidității mediului fermentativ cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată

Din figura 3.22 reiese că după 48 ore de fermentare, indiferent de nivelul de zaharoză adăugat, creșterea acidității este semnificativă; astfel, aciditatea mediului crește cu 32,03% pentru probele cu 1% mediu fermentativ, cu 28,36% pentru cele cu 3% zaharoză și respectiv cu 21,71% în cazul probelor cu adaos suplimentar de zaharoză 5% în mediul fermentativ.

Acest fapt arată că după 3 zile de fermentare, indiferent de nivelul zaharozei din mediul fermentativ crește semnificativ aciditatea mediului, proces datorat probabil intensificării proceselor fermentative în primele 48 de ore de fermentare. Valoarea pH-ului se stabilizează după 72 ore de fermentare, rămânând aproape constant după 96 ore de fermentare, indiferent de nivelul de zaharoză adăugată (figura 3.22). Explicația acestei evoluții se poate explica prin încetinirea sau chiar oprirea fermentării prin produsul de reacție.

În mod similar evoluției pH-ului și în cazul acidității titrabile se constată o stabilizare a valorii acesteia după a treia zi de fermentare (figura 3.22) când valorile acidității sunt cuprinse între 1,63-1,68 g acid lactic/100 ml mediu cu 1, respectiv 3% adaos de zaharoză și între 1,88-1,91 g acid lactic/100 ml mediu cu 5% adaos de zaharoză.

Evoluția acidității mediului fermentativ se corelează bine și cu variația cantității de glucide din boabele de soia prelucrate, (ținând cont însă și de nivelul zaharozei adăugate în mediul fermentativ) și cu durata de fermentare (vezi subcapitolul 3.5.1.4.).

**În concluzie, analizând toate aspectele descrise anterior, se poate afirma că cea mai eficientă combinație de parametri de fermentare pentru asigurarea unui pH și a unei acidități care să asigure conservarea limitată, în stare proaspătă a produselor procesate este adăugarea în mediul fermentativ a zaharozei în proporție de 3% și fermentarea pentru o durată de 48-72 ore, când și parametrii senzoriali sunt cei mai apreciați.**

**3.5.1.3. Evoluția numărului de bacterii lactice**

Numărul bacteriilor lactice din mediul fermentativ a fost determinat experimental, pentru toate probele investigate iar rezultatele sunt redată în tabelul 3.7.

**Tabelul 3.7.** Variația numărului de bacterii lactice cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză\*

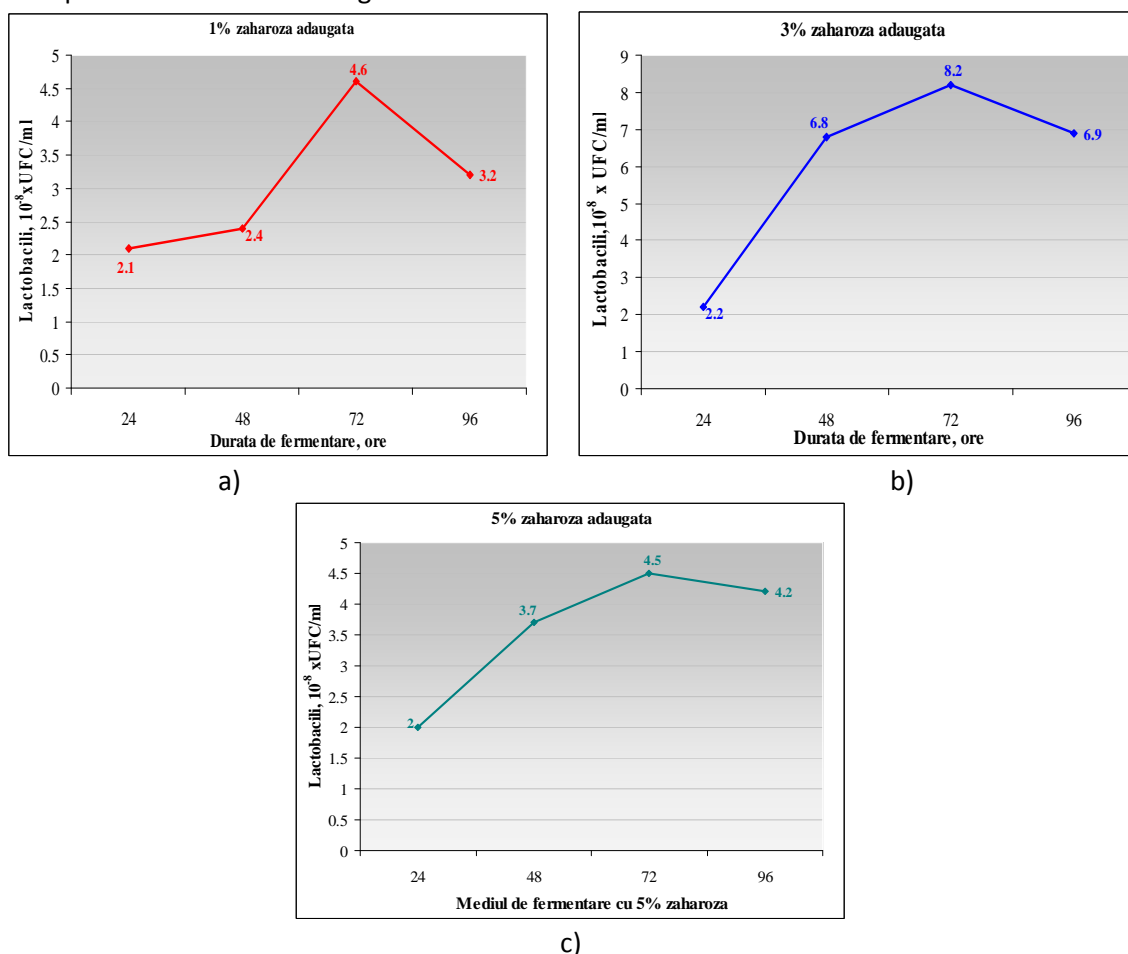
| Durata de fermentare, ore | Număr bacterii lactice, UFC / ml |                   |                   |                   |
|---------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                           | Mediu martor*                    | 1% zaharoză       | 3% zaharoză       | 5% zaharoză       |
| 0                         | $0,8 \times 10^8$                | -                 | -                 | -                 |
| 24                        | -                                | $2,1 \times 10^8$ | $2,2 \times 10^8$ | $2 \times 10^8$   |
| 48                        | -                                | $2,4 \times 10^8$ | $6,8 \times 10^8$ | $3,7 \times 10^8$ |
| 72                        | -                                | $4,6 \times 10^8$ | $8,2 \times 10^8$ | $4,5 \times 10^8$ |
| 96                        | -                                | $3,2 \times 10^8$ | $6,9 \times 10^8$ | $4,2 \times 10^8$ |

\*Valoarea reprezintă numărul de bacterii lactice din certificatul de conformitate al SC Alidan Serv SRL, Brăila

Evoluția numărului de lactobacili cu durata de fermentare și cu concentrația de zaharoză din mediul fermentativ este reprezentată în figura 3.23.

Se observă că după 48 ore de fermentare numărul bacteriilor lactice crește (cu 14,28% pentru 1% zaharoză, cu 209,09% pentru 3% zaharoză și cu 85% pentru 5% zaharoză în mediul fermentativ).

După 72 ore de proces fermentativ nivelul bacteriilor lactice ajunge valoarea maximă corespunzătoare la  $4,6 \times 10^8$  UFC/ml (în mediul de fermentare cu 1% zaharoză), la  $8,2 \times 10^8$  UFC/ml (pentru mediul cu 3% zaharoză) și la  $4,5 \times 10^8$  UFC/ml (pentru mediul cu 5% zaharoză). Aceste variații sunt cu mult mai mari decât cele înregistrate în prima zi de fermentare: cu 119,05%, 272,73%, respectiv cu 125% mai mari decât numărul de lactobacili din prima zi de fermentare, pentru probele de mediul de fermentare cu 1, 3 sau respectiv 5% zaharoză adăugată.



**Figura 3.23.** Evoluția numărului de lactobacili cu durata de fermentare și concentrația de zaharoză: a) 1% zaharoză, b) 3% zaharoză; c) 5% zaharoză



Această creștere se poate datora creșterii cantității de glucide ușor asimilabile ce sunt folosite de lactobacili ca sursă de carbon. Simultan, ca urmare a intensificării activității hidrolazelor, crește nivelul azotului solubil și aminic, surse preferate de azot de către lactobacili ceea ce duce la intensificarea creșterii lor numerice (vezi subcapitolul 3.5.1.5).

După 96 de ore de fermentare numărul lactobacililor începe să scadă, numărul lor ajungând la valori de  $3,2 \times 10^8$  UFC/ml (pentru mediul cu 1% zaharoză),  $6,9 \times 10^8$  UFC/ml (pentru mediul cu 3% zaharoză) și  $4,2 \times 10^8$  UFC/ml (pentru cel cu 5% zaharoză).

Scăderea aceasta se poate datora consumului de glucide, ca substrat de fermentare.

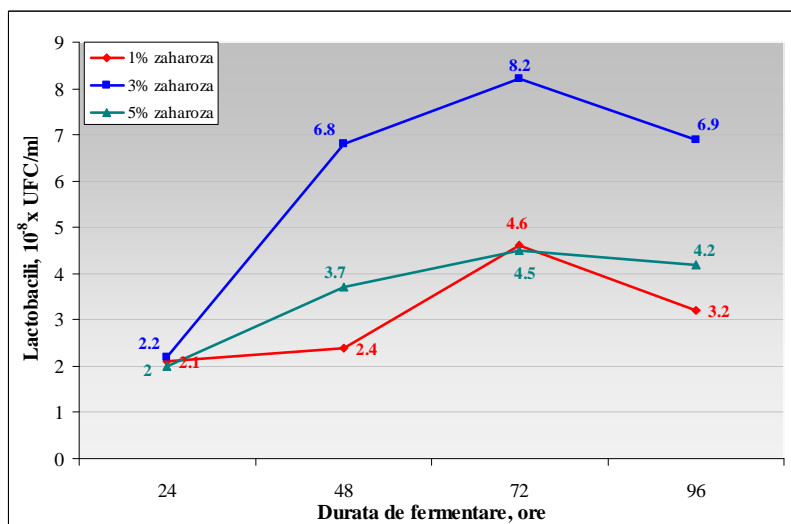


Figura 3.26. Evoluția numărului de lactobacili cu durata de fermentare

Cumulând datele în graficul din figura 3.26, se poate observa clar că faza de dezvoltare maximă a lactobacililor din mediul de fermentare este atinsă după 72 ore de fermentare în mediul cu 3% zaharoză adăugată; în aceste condiții numărul total al bacteriilor lactice este cu 78,26% mai mare decât cel pentru probele cu 1 și 5%, pentru ca apoi să scadă la  $6,9 \times 10^8$  UFC/ml, după 96 ore.

#### 3.5.1.4. Evoluția glucidelor solubile

În studiul de față ne-am axat pe urmărirea influenței germinării și a fermentației lactice asupra glucidelor solubile simple (fructoză, zaharoză, glucoză), dar și al modificărilor cantitative ale stahiozei și rafinozei, în funcție de durata de germinare și fermentare, cât și de cantitatea de zaharoză adăugată suplimentar în mediul fermentativ cu lactobacili.

##### 3.5.1.4.1. Glucidele solubile după germinare

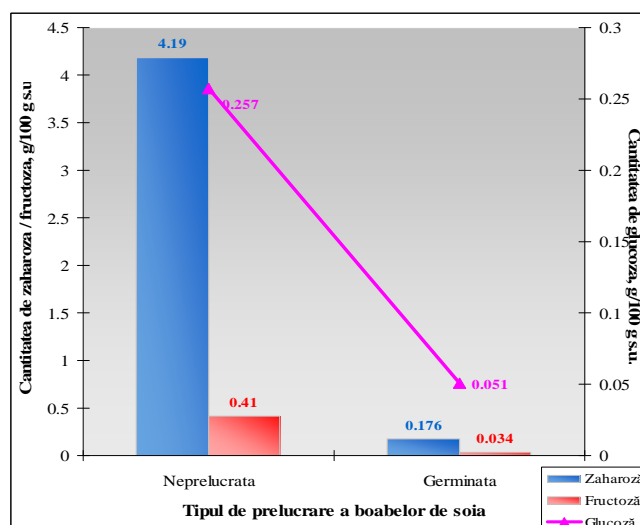
Modificările cantitative ale nivelului glucidelor solubile din boabele de soia prelucrate prin germinare sunt redată în tabelul 3.8.

Tabelul 3.8. Cantitatea de glucide solubile din boabele de soia germinate\*

| Tipul procesării     | Cantitatea de glucide, g/100 g s.u. |             |             |             |             |
|----------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                      | Zaharoză                            | Fructoză    | Glucoză     | Stahioză    | Rafinoză    |
| Soia negerminată (S) | 4.19±0.008                          | 0.41±0.007  | 0.257±0,008 | 4.198±0,055 | 1,780±0,010 |
| Soia germinată (SG)  | 0.176±0.004                         | 0.034±0.009 | 0,051±0,006 | 0,224±0,007 | 0,117±0,008 |

\* Valorile reprezintă media a două determinări ± devierea standard

Prin germinarea boabelor de soia timp de 4 zile la 25°C se poate observa o scădere a nivelului zaharozei cu 95,79% de la 4,19 g/100 g s.u. în boabele neprelucrate la 0,176 g/100 g s.u. în cele germinate (figura 3.29).

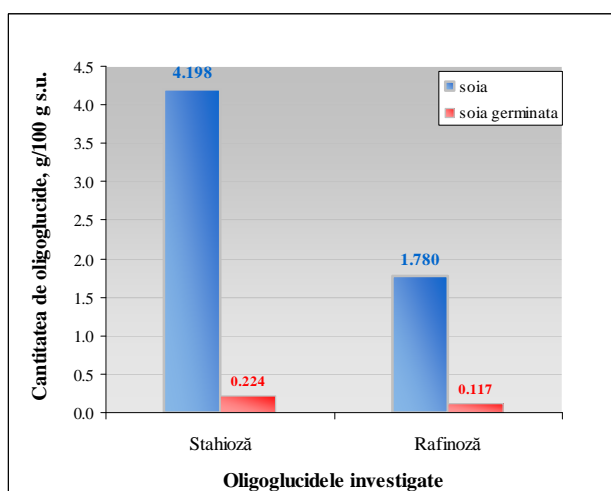


**Figura 3.29.** Variația glucidelor simple din boabele de soia prin germinare timp de 4 zile la 25°C.

De asemenea, scade și nivelul celorlalte glucide simple din boabele de soia: cu 91,71% fructoză și cu 80,16% glucoză după 4 zile de germinare la 25°C.

În primele etape ale germinării boabelor de soia au loc procese intense de hidroliză a glucidelor complexe cu formarea de glucoză, fructoză, maltoză, zaharoză, pentru ca apoi, începând din a patra zi de germinare să intervină faza de sinteză a substanțelor proprii noii plante, proces care determină antrenarea glucidelor sub formă de glucoză în procesele de biosinteză. În același timp, glucidele simple rezultate din hidroliza poliglucidelor se consumă la germinare în procesele de respirație și sunt utilizate pentru sinteza zaharozei sau a amidonului, ca glucide de rezervă (Burzo, 1999). În acest fel se poate explica evoluția descendentă a nivelului glucidelor solubile în timpul germinării conduse la 25°C timp de 4 zile.

În ceea ce privește evoluția cantității de *oligoglucide*, acestea scad drastic după 4 zile de germinare a boabelor de soia la 25°C. Astfel, din figura 4.31 se observă că stahioza scade cu 94,66% iar rafinoza cu 93,43%. Această scădere a stahiozei și rafinozei s-ar putea explica prin activarea în timpul germinării a enzimei  $\beta$ -galactozidază care hidrolizează legăturile 1,6- $\beta$ -glicozidice cu eliberarea glucidelor simple (Zdunczyk, 2011). Astfel, se produce concomitent o scădere a efectelor negative produse de oligoglucide în tractul gastrointestinal.



**Figura 3.31.** Evoluția oligoglucidelor în timpul germinării boabelor de soia 4 zile la 25°C

În figurile 3.32 și 3.33 sunt redată cromatogramele probelor de soia semințe, neprelucrată și cele pentru soia germinată, obținute prin HPLC.

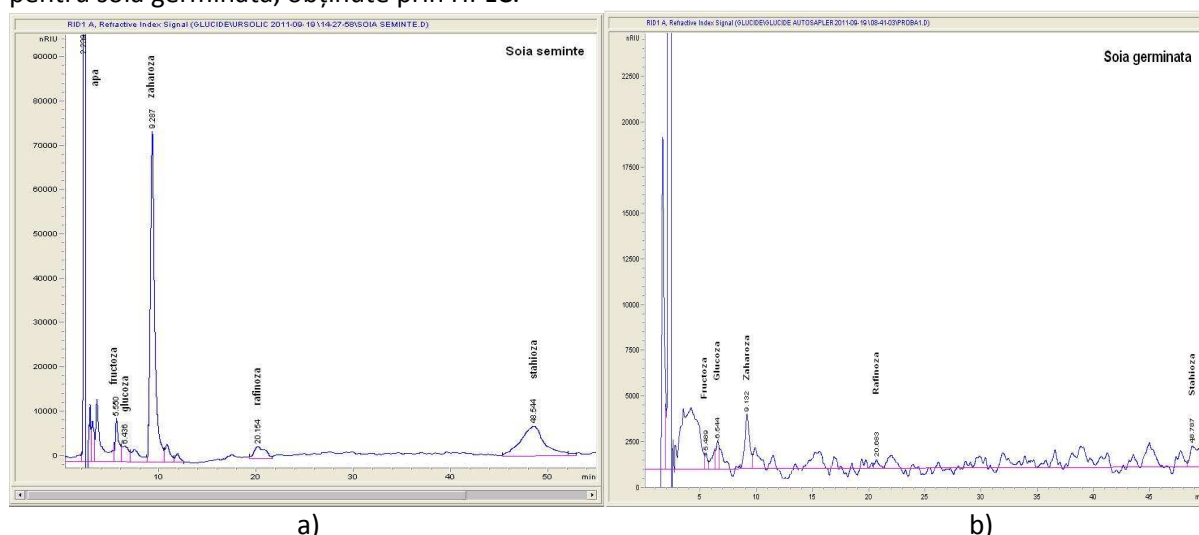


Figura 3.32. Cromatograme pentru probele de soia: a) soia semințe (neprelucrată); b) soia germinată

### 3.5.1.4.2. Glucidele solubile din soia fermentată lactic după germinare

Boabele germinate de soia au fost supuse fermentației lactice prin imersarea lor într-un extract din tărate de grâu fermentate (conținând  $0,8 \times 10^8$  UFC/ml *Lactobacillus* și având un pH de 2.5). Mediul fermentativ a fost suplimentat cu zaharoză în proporție de 1, 3 sau 5%, apoi au fost investigate sub aspectul modificării conținutului glucidelor simple (zaharoză, fructoză, glucoză) și oligoglucide (stahioză și rafinoză).

#### a) Evoluția zaharozei din bob în timpul fermentației lactice

Rezultatele experimentale cu privire la variația cantității de zaharoză cu durata de fermentare și cu nivelul zaharozei suplimentare sunt redată în tabelul 3.9.

Tabelul 3.9. Variația cantității de zaharoză cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

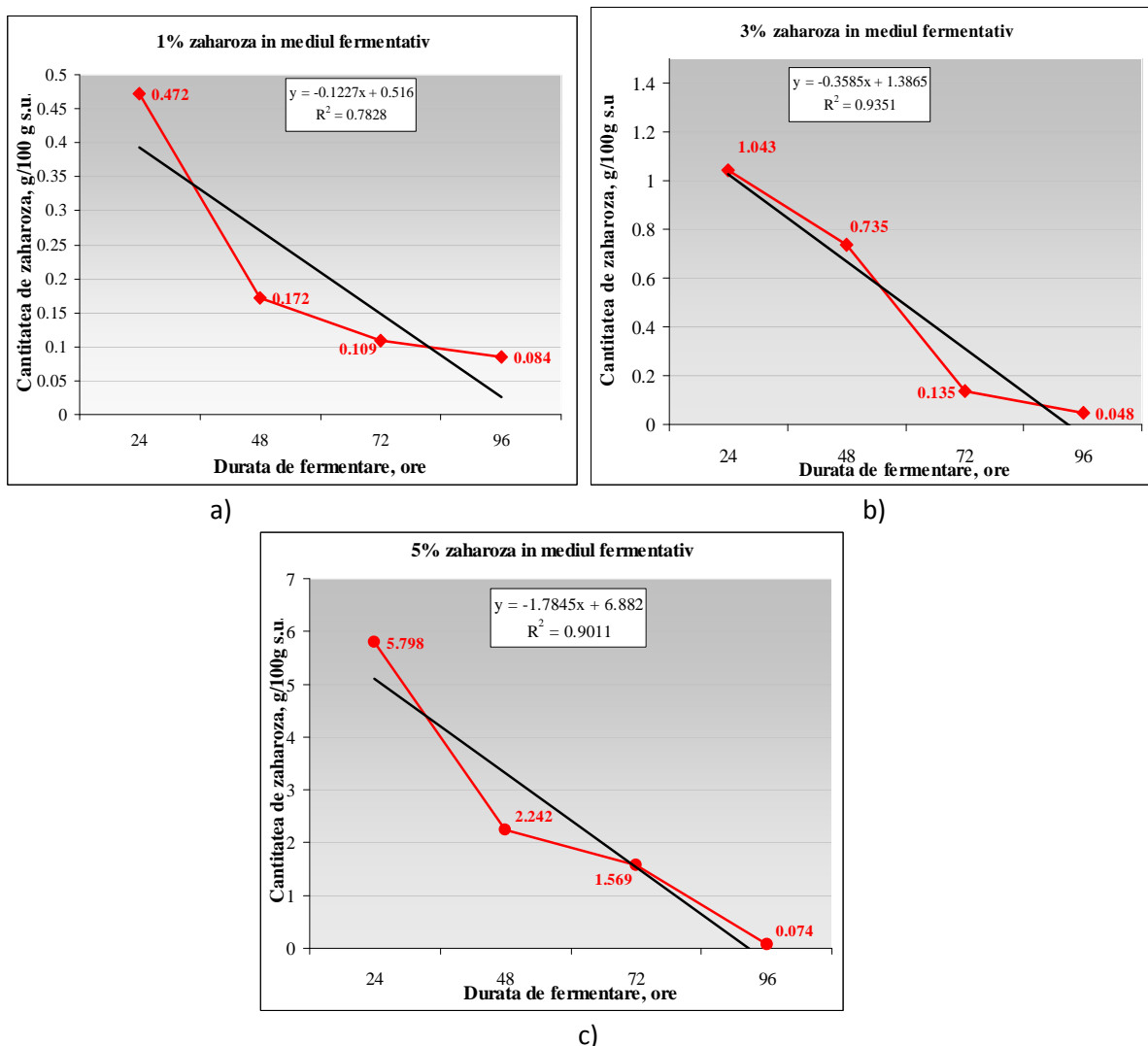
| Durata de fermentare, ore | Cantitatea de zaharoză în bob, g/100 g s.u. |                      |                      |
|---------------------------|---|----------------------|----------------------|
|                           | 1% zaharoză în mediu                        | 3% zaharoză în mediu | 5% zaharoză în mediu |
| 24                        | 0.472±0.007                                 | 1.043±0.011          | 5.798±0.006          |
| 48                        | 0.172±0.008                                 | 0.735±0.004          | 2.242±0.010          |
| 72                        | 0.109±0.004                                 | 0.135±0.003          | 1.569±0.012          |
| 96                        | 0.084±0.003                                 | 0.048±0.006          | 0.074±0.005          |

\* Valorile reprezintă media a două determinări ± devierea standard

Făcând o analiză a tendinței urmate de cantitatea de zaharoză acumulată în boabele de soia prin fermentare, se constată că aceasta scade cu durata de fermentare, pentru toate nivelurile de adaos suplimentar de zaharoză în mediul fermentativ (figura 3.34 a, b și c).

Se constată că prin fermentarea într-un mediu cu 1% zaharoză, în boabele de soia se înregistrează o scădere liniară a cantității de zaharoză de la 0,472 g/100 g s.u. (după 24 ore de fermentare) până la un minim de 0,084 g/100 g s.u. după 96 ore de fermentare, scădere de 5,62 ori față de durata inițială de fermentare de o zi.

Aceeași tendință descrescătoare s-a înregistrat și în cazul fermentării boabelor de soia în mediu fermentativ cu 3% zaharoză, scăderea făcându-se până la 0,048 g zaharoză/100 g s.u. după 96 ore de fermentare, cu 95,39% față de fermentarea timp de 24 ore.



**Figura 3.34.** Evoluția cantității de zaharoză din boabele de soia cu durata de fermentare și adaosul suplimentar de zaharoză în mediul fermentativ: a) 1%, b) 3% și c) 5%

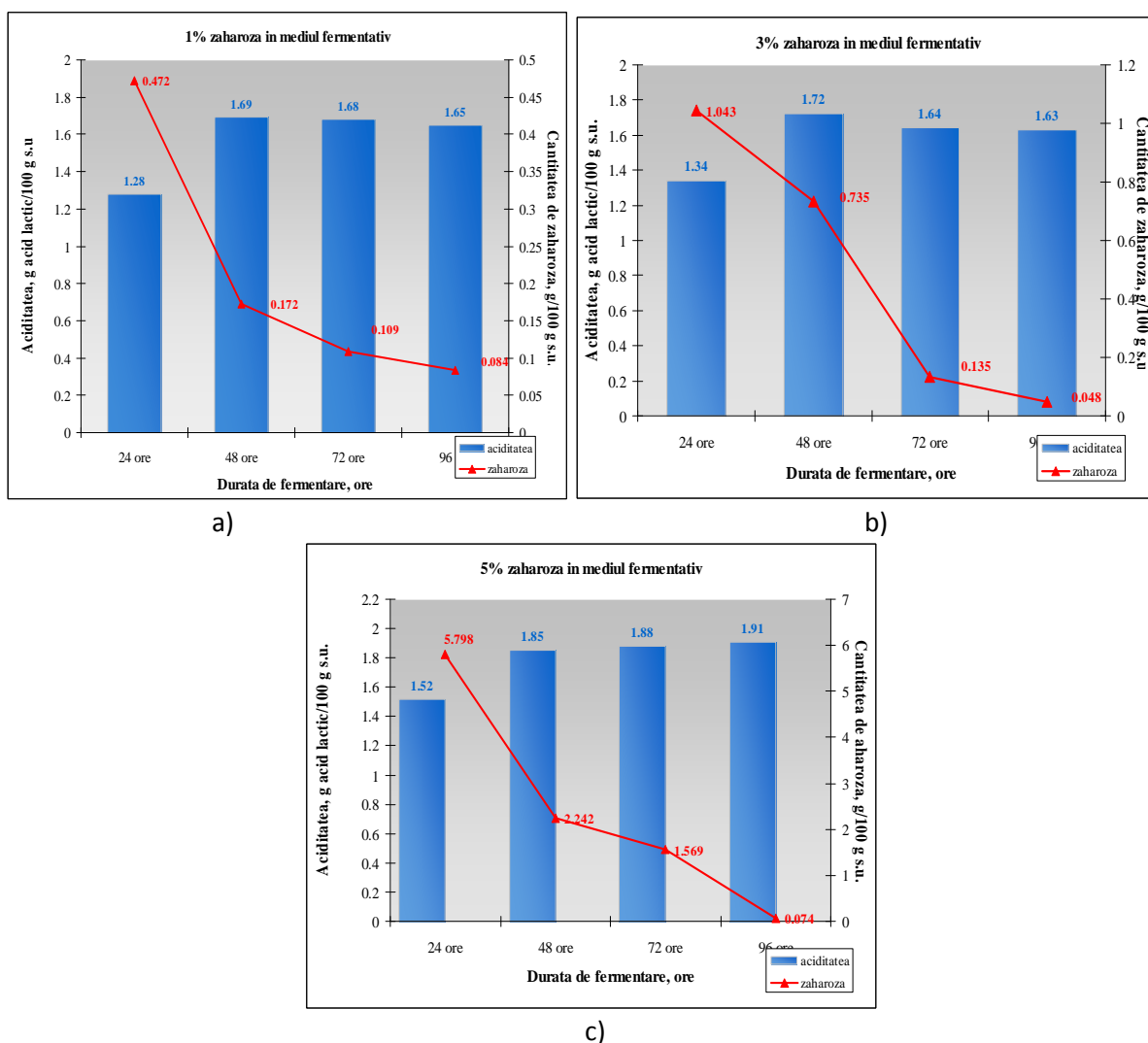
În cazul boabelor de soia fermentate într-un extract cu lactobacili îmbogățit cu 5% zaharoză, după 24 ore de fermentare nivelul zaharozei din bob a fost de 5,798 g/100 g s.u. și a scăzut până la 0,074 g/100 g s.u., cu 98,72% după 96 ore de fermentație lactică.

Scăderea semnificativă a zaharozei din boabele de soia germinate supuse fermentației lactice se poate explica prin aceea că bacteriile din genul *Lactobacillus*, prezente în mediul fermentativ, transformă acest diglucid în acid lactic și  $CO_2$ , procesul fiind intensificat de prezența suplimentară a zaharozei în mediul fermentativ. În același timp, zaharoză este hidrolizată enzimatic de invertaza microbiană a lactobacililor, ceea ce duce la scăderea ei cantitativă în bob.

Indiferent de procentul de zaharoză adăugat suplimentar în mediul fermentativ (1, 3 sau 5%), nivelul acesteia după 96 de ore de fermentare este subunitar, ajungând la valori de 0,084, 0,048 și respectiv 0,074 g/100 g s.u. dar aciditatea finală a probelor este diferită ca urmare a intensității cu care se desfășoară fermentația și a acumulării acidului lactic în bob.

Având în vedere interdependența dintre nivelul zaharozei consumate în timpul fermentației și cantitatea de acid lactic formată ca efect al activității bacteriilor lactice am reprezentat în figura 3.35 (a, b și c) corelațiile dintre acești doi parametri.

Astfel, se poate vedea că în primele 24 de ore de fermentare a boabelor într-un mediu cu 1% zaharoză, cantitatea de zaharoză din bob scade foarte mult, de 2,74 ori, ceea ce are ca efect creșterea semnificativă a acidității mediului, cu 32,03%. Scăderea nivelului zaharozei din boabe continuă accentuat până la 72 ore de fermentare, pentru că în ultimele 24 ore de prelucrare scăderea este mai lentă, la un nivel de 0,084g/100 g s.u. (timp în care și valoarea acidității se stabilizează).



**Figura 3.35.** Corelația evoluției zaharozei cu aciditatea totală a mediului fermentativ: a) 1%, b) 3% și c) 5%

Coeficientul de corelație Pearson între conținutul de zaharoză și nivelul acidității mediului fermentativ cu 1% zaharoză este -0.928, de unde rezultă că cei doi parametri se corelează invers proporțional foarte bine, valorile fiind apropiate de -1.

Aceeași corelație se poate observa și pentru celelalte două variante de adaos suplimentar de zaharoză: cantitatea de zaharoză din boabele de soia prelucrate scade brusc după 72 ore cu 87,06% și cu 72,94% pentru probele cu 3, respectiv 5% zaharoză suplimentară, pentru ca după încă 24 ore de fermentare finală să scadă din nou cu 64,44% și 95,28% (pentru 3 respectiv 5%).

Conținutul de zaharoză din boabele de soia germinate și fermentate și aciditatea totală a mediului fermentativ se corelează negativ și pentru ultimele două valori ale nivelului suplimentar de zaharoză, coeficientul de corelație Pearson între cei doi parametri fiind de -0,954 (pentru 3%) și respectiv - 0.997 (pentru 5%).

### b) Evoluția fructozei din bob în timpul fermentației lactice

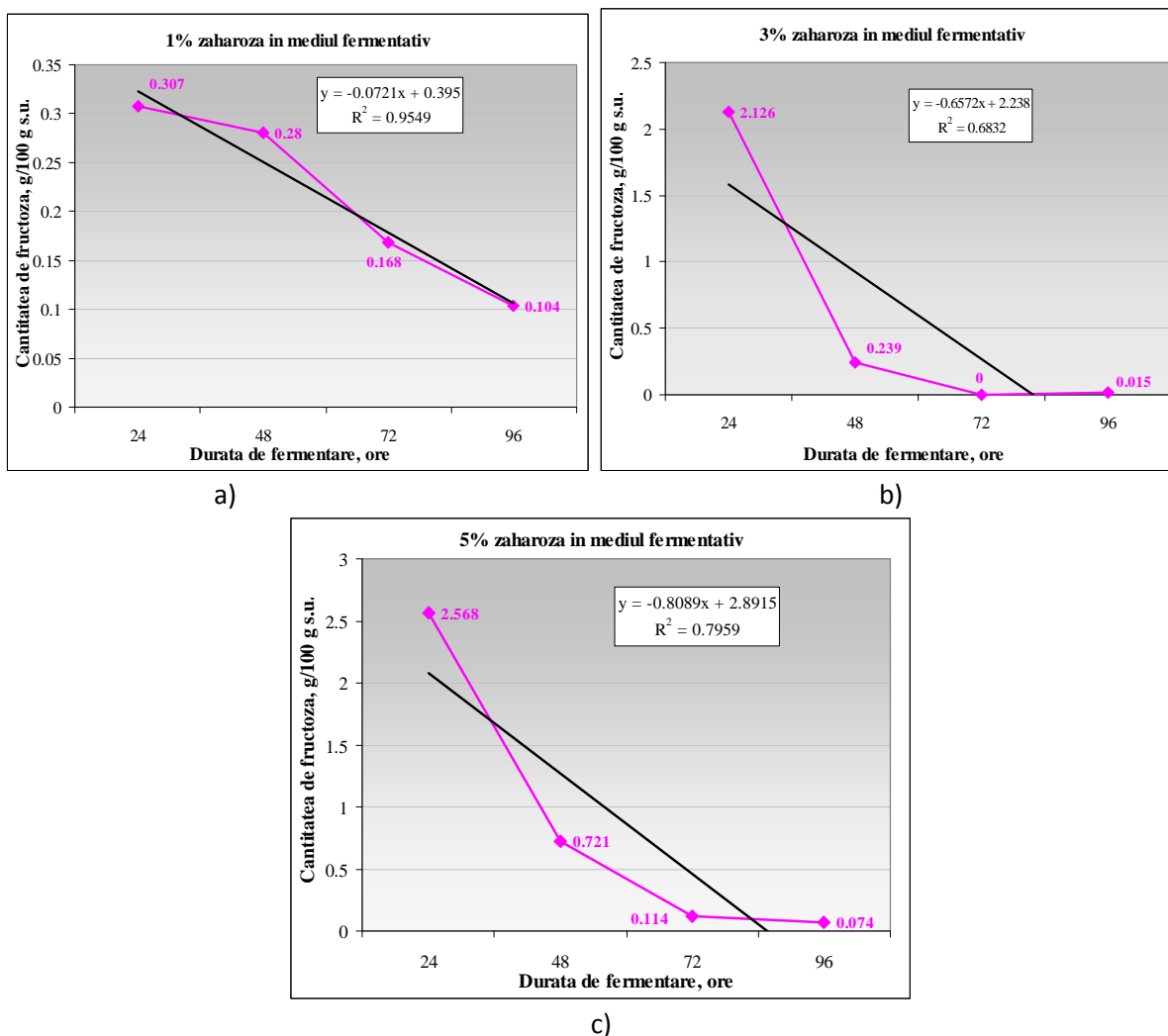
Evoluția nivelului **fructozei** este de asemenea influențată de germinare, de durata de fermentare și de nivelul adaosului exogen de zaharoză în mediul fermentativ, iar rezultatele determinărilor experimentale sunt redată în tabelul 3.10.

**Tabelul 3.10.** Variația cantității de fructoză cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

| Durata de fermentare, ore | Cantitatea de fructoză în bob, g/100 g s.u. |                      |                      |
|---------------------------|---|----------------------|----------------------|
|                           | 1% zaharoză în mediu                        | 3% zaharoză în mediu | 5% zaharoză în mediu |
| 24                        | 0.307±0.010                                 | 2.126±0.011          | 2.568±0.005          |
| 48                        | 0.28±0.007                                  | 0.239±0.010          | 0.721±0.006          |
| 72                        | 0.168±0.014                                 | 0±0.002              | 0.114±0.003          |
| 96                        | 0.104±0.002                                 | 0.015±0.005          | 0.074±0.012          |

\* Valorile reprezintă media a două determinări ± devierea standard

În același timp, s-a reprezentat grafic evoluția cantității de fructoză din boabele germinate și fermentate timp de 24, 48, 72 și 96 ore într-un mediu în care nivelul zaharozei a fost variat (1, 3 și 5%), figura 3.36 a, b și c.



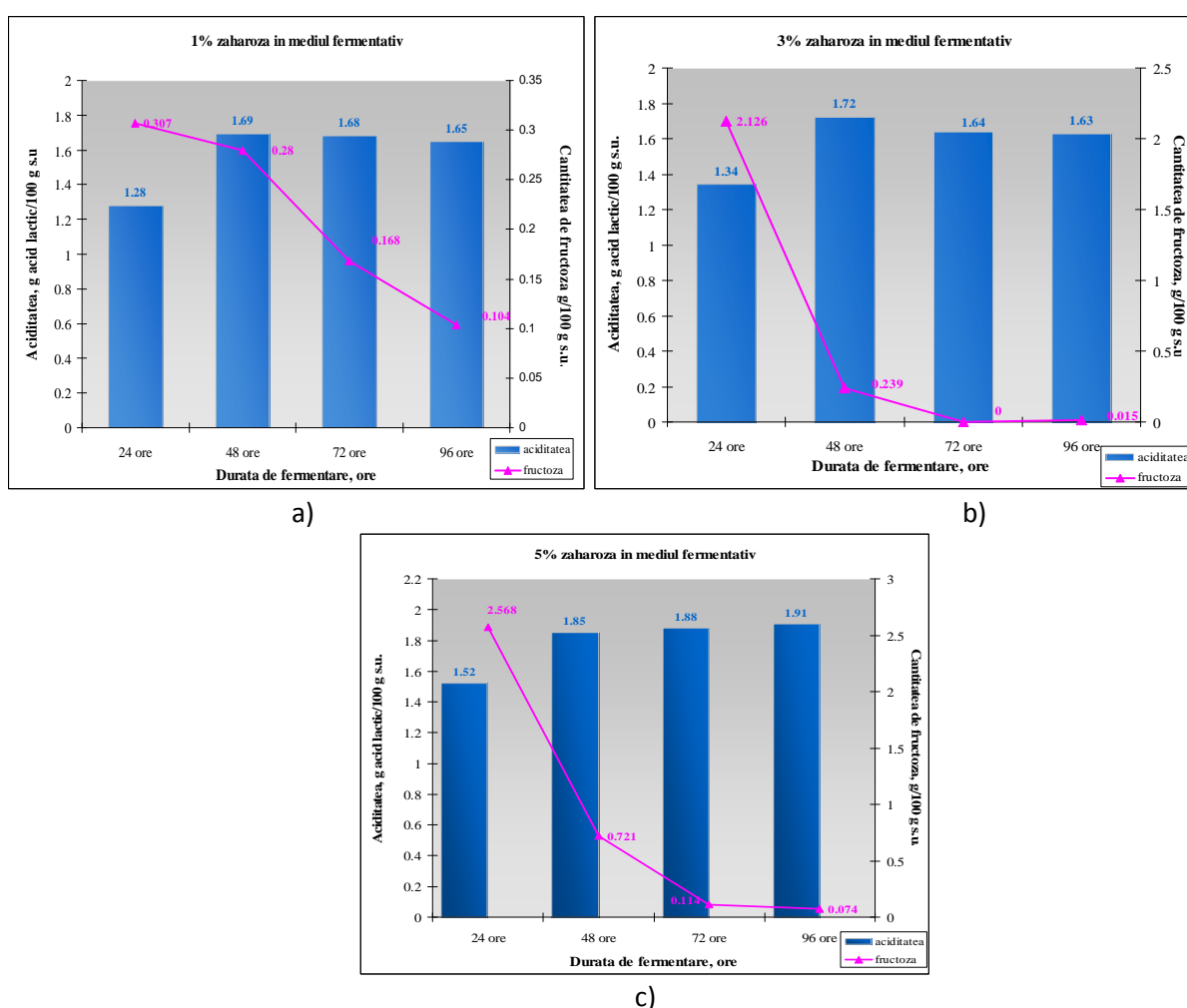
**Figura 3.36.** Evoluția cantității de fructoză din boabele de soia cu durata de fermentare și adaosul suplimentar de zaharoză în mediul fermentativ: a) 1%, b) 3% și c) 5%

Așa cum reiese din analiza figurii 3.36 a, cantitatea de fructoză are o evoluție descendentă lineară cu durata de fermentare. Astfel, după primele 24 ore de fermentare în mediu cu 1% zaharoză, când cantitatea de fructoză este de 0,307 g/100 g s.u., apoi scade de 1,83 ori, la 0,168 g/100g s.u. după 72 ore de fermentare. În ultimele 24 ore de fermentare, cantitatea de fructoză scade cu 38,09%, ajungând la valori de 0,104g/100 g s.u.

Aceeași evoluție se constată și pentru celelalte două variante de fermentare, cu 3 respectiv cu 5% (figura 3.36 b, c). Cantitatea de fructoză din boabele de soia scade brusc în primele 48 ore de 8,9 ori, respectiv de 3,56 ori, pentru ca după 96 ore să ajungă la valori foarte mici de 0,015 g/100 g s.u., respectiv 0,074 g /100g s.u.

Evoluția descendentă a fructozei în timpul fermentării boabelor de soia, indiferent de suplimentarea mediului cu zaharoză se poate explica prin aceea că fructoza se poate metaboliza după izomerizarea ei în glucoză, pe calea transformării în acid lactic, sub acțiunea echipamentului enzimatic specific bacteriilor din genul *Lactobacillus*.

În figura 3.37 am reprezentat corelația dintre cantitatea de fructoză a boabelor de soia germinate și fermentate cu adaos suplimentar de zaharoză și aciditatea mediului de fermentare. Corelația este de negativă, cu cât scade cantitatea de fructoză, cu atât crește aciditatea mediului de fermentare, ca urmare a formării acidului lactic, indicator al acțiunii lactobacililor.



**Figura 3.37.** Corelația evoluției fructozei cu aciditatea totală a mediului fermentativ:

a) 1%, b) 3% și c) 5%

Coeficientul de corelație Pearson între conținutul de fructoză și nivelul acidității mediului fermentativ este 0,583, pentru 1% zaharoză, 0,939 (3%); 0,989 (5%), de unde rezultă că cei doi parametri se corelează proporțional foarte bine.

### c) Evoluția glucozei din bob în timpul fermentației lactice

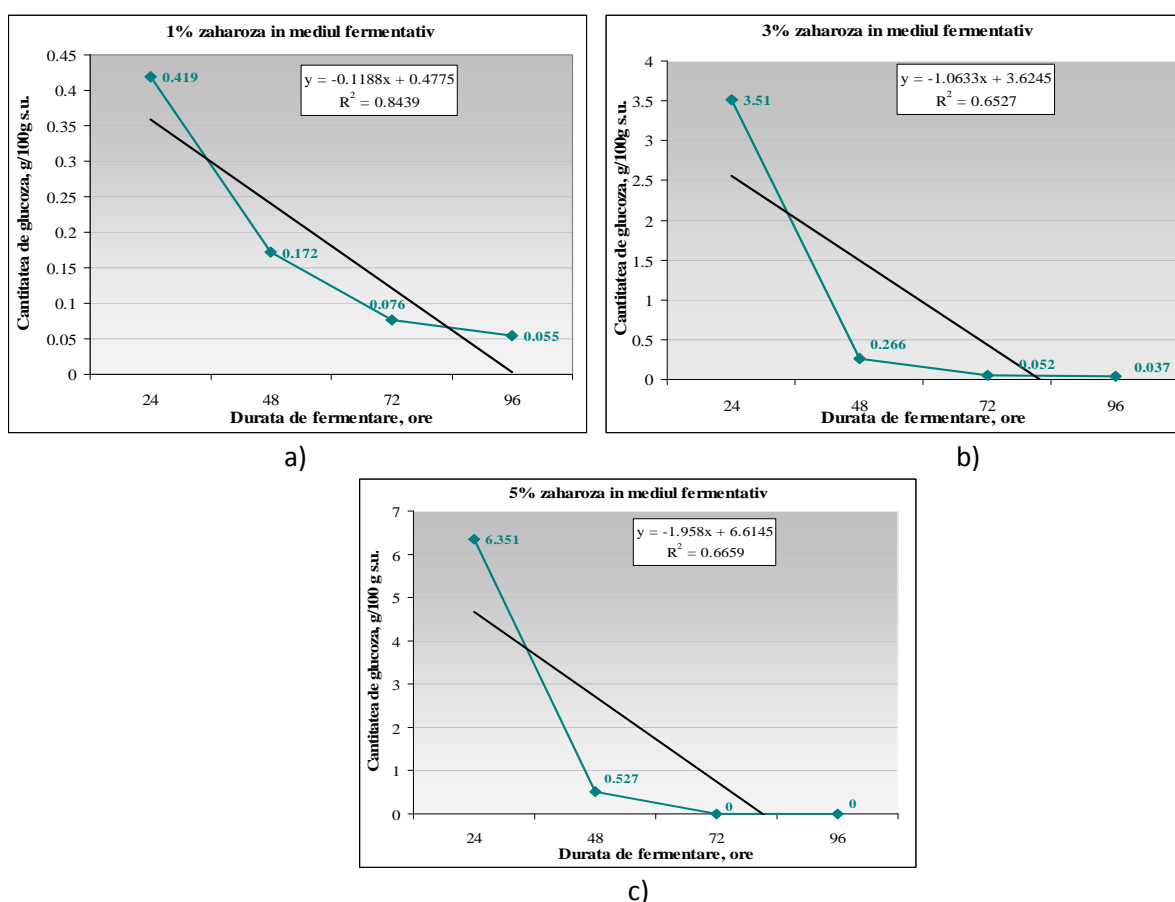
Cantitatea de **glucoză** determinată pentru probele de soia germinate timp de 4 zile la 25°C și apoi fermentate timp de 24, 48, 72 și 96 ore într-un mediu fermentativ cu *Lactobacillus*, cu 1,3 sau 5% adaos de zaharoză sunt redată în tabelul 4.10.

**Tabelul 3.11.** Variația cantității de glucoză cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

| Durata de fermentare, ore | Cantitatea de glucoză în bob, g/100 g s.u. |                      |                      |
|---------------------------|--|----------------------|----------------------|
|                           | 1% zaharoză în mediu                       | 3% zaharoză în mediu | 5% zaharoză în mediu |
| 24                        | 0.419±0,009                                | 3.510±0,010          | 6.351±0,012          |
| 48                        | 0.172±0,014                                | 0.266±0,011          | 0.527±0,008          |
| 72                        | 0.076±0,011                                | 0.052±0,002          | 0                    |
| 96                        | 0.055±0,003                                | 0.037±0,006          | 0                    |

\* Valorile reprezintă media a două determinări ± devierea standard

Astfel pentru fermentarea boabelor de soia cu 1% zaharoză, nivelul glucozei în bob atinge în primele 24 ore valori de 0,419 g/100 g s.u. (figura 3.37). Această valoare scade apoi continuu cu durata de fermentare ajungând la 0,055 g/100 g s.u. după 96 de ore de fermentare, o scădere cu 86,87% față de cea înregistrată la începutul fermentării (figura 3.38 a).



**Figura 3.38.** Evoluția cantității de glucoză din boabele de soia cu durata de fermentare și adaosul suplimentar de zaharoză în mediul fermentativ: a) 1%, b) 3% și c) 5%

Și în cazul fermentării într-un mediu cu 3, respectiv 5% zaharoză a boabelor de soia germinate (figura 3.38 b, c) se observă scăderea cantitativă a glucozei după 96 ore de fermentare cu 98,95% pentru ca în probele fermentate cu 5% adaos glucoza să nu mai fie decelată în boabele fermentate încă din a treia zi de fermentare. Acest lucru se explică prin aceea că glucoza este glucidul cel mai implicat în procesul de fermentație lactică.

Scăderea glucozei din soia germinată și fermentată cu durata de fermentare și particularitățile mediului fermentativ este liniară. Luând în calcul semnificațiile și ecuația de definiție a curbei, se poate observa că  $R^2$  este mai mare de 0.8 pentru probele fermentate cu 1% zaharoză și mai mare de 0,65 pentru cele cu 3, respectiv 5% zaharoză, ceea ce arată o bună definire a evoluției cantității de glucoză de către ecuația drepte de regresie, la un nivel al semnificației de 5% ( $p < 0,5$ ).



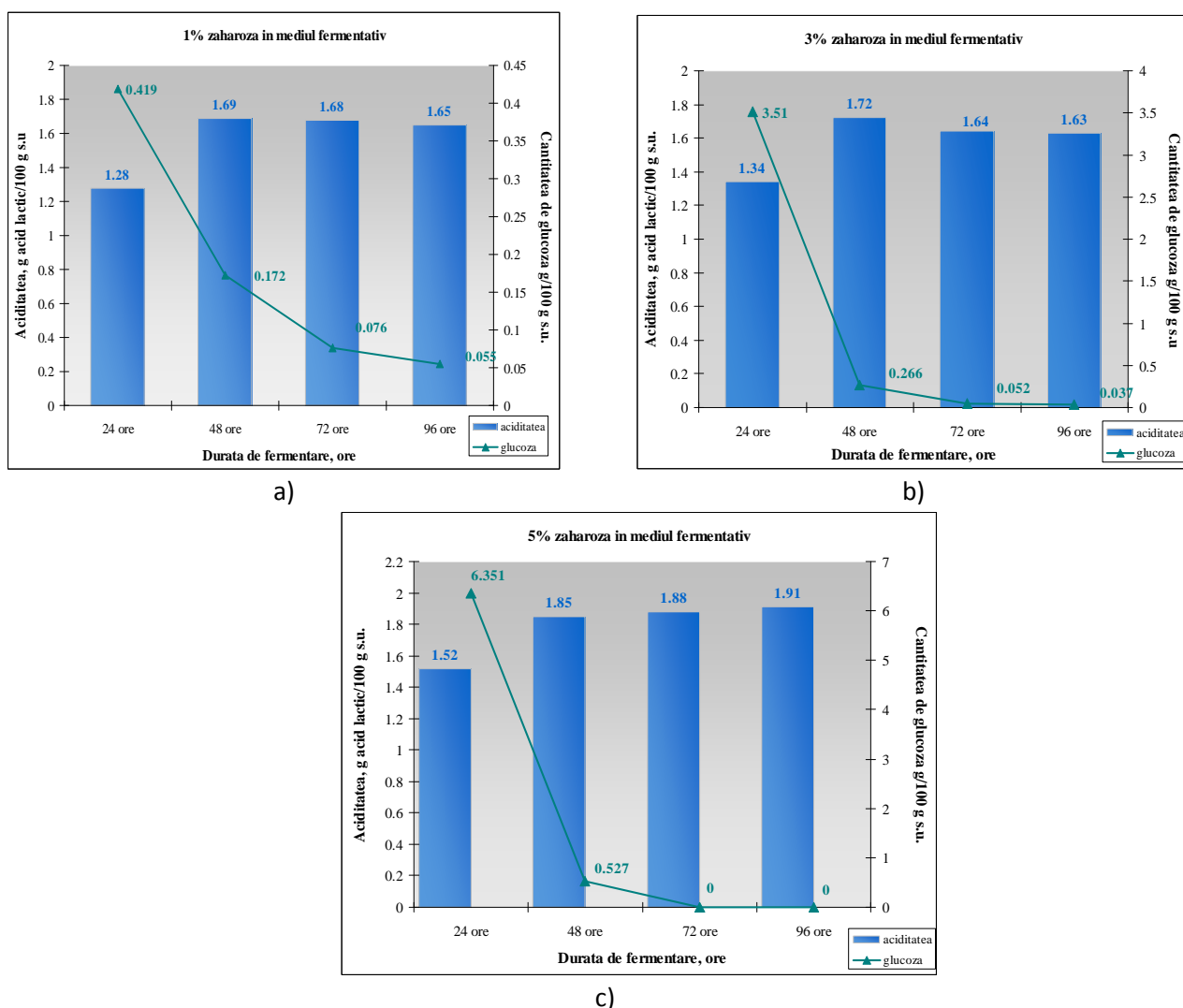
Glucoza este monoglucidul preferat de bacteriile din genul *Lactobacillus* ca sursă de carbon pentru fermentație. Așadar, a fost interesant de observat evoluția cantitativă a glucozei prin corelație cu aciditatea mediului fermentativ, ca efect al acțiunii bacteriilor lactice (figura 3.39 a, b și c)

Așa cum se poate vedea în figura 3.39 a, o dată cu scăderea cantității de glucoză crește nivelul acidității totale a mediului fermentativ. Scăderea este mai intensă în primele 72 ore, când nivelul glucozei ajunge cu 81,86% mai mic decât în prima zi de fermentare, pentru ca apoi să scadă mai lent cu 27,63% în ultimele 24 ore ale fermentației lactice.

Corelarea cantității de glucoză cu aciditatea mediului fermentativ cu 3, respectiv 5% zaharoză este tot inversă (figura 3.39 b, c), astfel încât creșterea acidității totale a mediului cu durata de fermentare este realizată pe baza scăderii glucozei din bob, ca urmare a consumului ei și a conversiei în acid lactic prin fermentare. În ultima parte a fermentației, după 96 ore, datorită inhibării procesului prin produsul de reacție (acidul lactic), nivelul acidității se stabilizează, iar cantitatea de glucoză scade mult mai lent, cu 28,85% (pentru probele fermentate cu 3% zaharoză) și ajunge la zero pentru cele cu 5% zaharoză.

Pentru redarea gradului de corelare a celor doi parametri, cantitatea de glucoză și aciditatea mediului, s-a calculat coeficientul Pearson, R care este un indice adimensional cuprins între -1,0 și 1,0 inclusiv și reflectă întinderea relației liniare dintre cele două seturi de date.

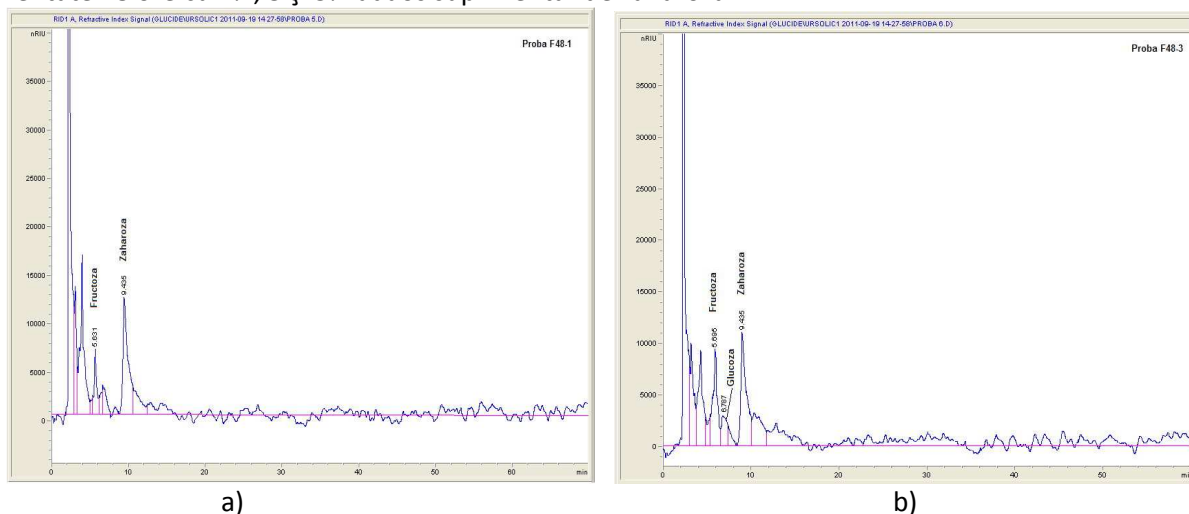
În situația de față, coeficientul Pearson este -0,928 pentru probele de mediu cu adaos de 1% zaharoză, -0,954 pentru 3% și -0,997 pentru 5%, nivel al zaharozei din mediul fermentativ. Toți acești indici arată un bun grad de corelare invers proporțional ai celor doi parametri investigați.



**Figura 3.39.** Corelația evoluției glucozei cu aciditatea totală a mediului fermentativ: a) 1%, b) 3% și c) 5%

Această evoluție se poate datora consumului de glucoză în timpul fermentației, fie datorită utilizării ei de către bacterii pentru creștere, fie este transformată în acid lactic, ca urmare a proceselor specifice fermentației produse de *Lactobacillus*.

În figura 3.41 sunt redată pentru exemplificare cromatogramele obținute în cazul probelor germinate și fermentate 48 ore cu 1%, 3 și 5% adaos suplimentar de zaharoză.



**Figura 3.41.** Cromatograme pentru soia germinată și fermentată 48 ore: a) 1% zaharoză și b) 3% zaharoză;

În **concluzie**, în timpul germinării și al fermentației lactice au loc transformări importante la nivelul glucidelor simple din boabele de soia.

☞ Prin germinarea boabelor de soia timp de 4 zile la 25°C se poate observa din figura 2.15. o scădere a nivelului zaharozei cu 95,79% a nivelului de zaharoză de la 4,19 g/100 g s.u. în boabele neprelucrate la 0,176 g/100 g s.u. în cele germinate.

☞ Fermentația lactică a boabelor de soia supuse inițial germinării determină consumul de zaharoză, glucoză și fructoză de bacteriile lactice din genul *Lactobacillus* și convertirea lor prin procesele biochimice specifice în acid lactic.

☞ Corelarea datelor referitoare la evoluția nivelului zaharozei, fructozei și glucozei arată o bună corelație a interdependenței celor trei glucide implicate în procesul fermentativ al boabelor de soia germinate.

### 3.5.1.4.3. Oligoglucidele din soia germinată și fermentată lactic

În lucrarea de față a fost investigată și evoluția factorilor de flatulență (stahioza și rafinoza) cu durata de fermentare și aportul suplimentar de zaharoză din mediul fermentativ. Rezultatele sunt redată tabelar (tabelul 3.12) și grafic.

**Tabelul 3.12.** Variația cantității de stahioză și rafinoză cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

| Tipul de boabe de soia                          | Cantitatea de stahioză, g/100 g s.u. | Cantitatea de rafinoză, g/100 g s.u. |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Soia crudă                                      | 4.198±0,055                          | 1,780±0,010                          |
| Soia germinată 4 zile/25°C                      | 0,224±0,007                          | 0,117±0,008                          |
| Soia germinată și fermentată                    |                                      |                                      |
| Concentrația de zaharoză din mediul fermentativ | 1%                                   | 0,103±0,006                          |
|   | 3%                                   | 0                                    |
|   | 5%                                   | 0                                    |

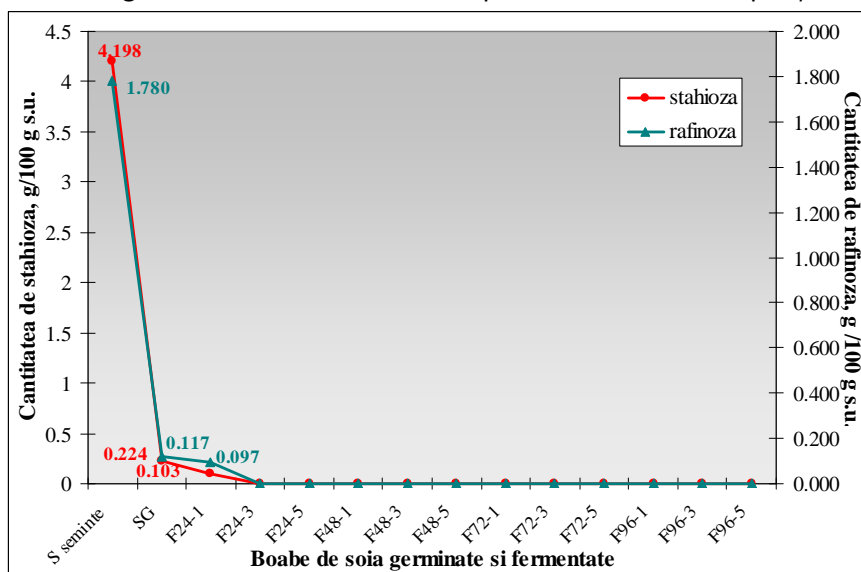
\* Valorile reprezintă media a două determinări ± devierea standard

Așa cum reiese din figura 3.46, atât rafinoza cât și stahioza scad evident prin germinare: după germinarea timp de 4 zile la 25°C nivelul stahiozei scade cu 96,66% și al rafinozei cu 93,43% comparativ cu boabele de soia negerminate.

Fermentarea în mediu cu 1% zaharoză timp de 24 ore determină o reducere a cantității de stahioză și rafinoză cu 97,55%, respectiv 94,55% față de soia negerminată.

Astfel, prin fermentare, ca procedeu suplimentar de prelucrare a boabelor de soia germinate se înregistrează o reducere a nivelului de stahioză și rafinoză cu încă 54,02%, respectiv 17,09%, comparativ cu cel decelat în probele germinate.

În probele fermentate timp de 24 ore cu 3 sau 5% adaos suplimentar de zaharoză, nici stahioza și nici rafinoza nu au mai putut fi detectate, ceea ce înseamnă că din acest punct de vedere (al scăderii factorilor de flatulență), combinarea germinării cu fermentarea timp de 24 ore duce la dispariția oligoglucidelor.



**Figura 3.46.** Evoluția stahiozei și rafinozei prin germinare și fermentare funcție de durată și cantitatea de zaharoză adăugată

Explicația reducerii și dispariției din boabele de soia germinate și fermentate a rafinozei și stahiozei se poate baza pe abilitatea microorganismelor din mediul fermentativ de a produce  $\alpha$ -galactozidază ce hidrolizează legăturile  $\alpha$ -1,6-glicozidice, cu formare de glucide simple care fie sunt folosite ca substrat de fermentare, fie sunt utilizate ca sursă de carbon de către lactobacili.

În concluzie, procesarea boabelor de soia (*Glycine max.*) prin germinarea timp de 4 zile la 25°C și fermentația lactică (prin imersarea într-un extract fermentativ obținut din tărâțe de grâu cu un aport de 1, 3 sau 5% zaharoză timp de 24, 48, 72 și 96 ore) determină dispariția oligoglucidelor din boabe.

Această modificare a oligoglucidelor conduce la o îmbunătățire a calității nutriționale a boabelor de soia, prin prisma reducerii efectelor digestive nedorite determinate de rafinoză și stahioză ceea ce face consumul fără restricții a acestei leguminoase, recomandând-o ca aliment funcțional, de introdus într-o dietă sănătoasă.

### 3.5.1.5. Evoluția cantității de azot

În timpul germinării, compușii cu azot din boabele de soia suferă modificări sensibile ca urmare a hidrolizei proteinelor cu formarea peptidelor cu masă moleculară mică și a aminoacizilor. simultan, încep procesele de sinteză a substanțelor proteice specifice noii plante ce își începe dezvoltarea.

În timpul fermentației lactice au loc sub acțiunea proteazelor din tărâțele de grâu (materia primă pentru obținerea mediului fermentativ) sau a celor microbiene (din lactobacili) modificări ale compușilor macromoleculari cu azot.

În schimb, evoluția azotului solubil (neproteic) și aminic este interesant de urmărit, deoarece acestea suferă modificări semnificative (Egounlety, 2003, Khalil, 2006).

**3.5.1.5.1. Evoluția azotului solubil (neproteic)**

Prin germinare și fermentație lactică procesele de hidroliză a proteinelor sunt intense, așa încât sub acțiunea proteazelor, substanțele proteice sunt degradate până la compuși simpli cu azot, peptide, aminoacizi și chiar amoniac.

Azotul solubil reprezintă partea neproteică din azotul boabelor de soia, rezultat după precipitarea proteinelor cu acid tricloracetic și separarea lor.

Evaluarea cantității de azot neproteic reprezintă un indicator al gradului de hidroliză a proteinelor și implicit al intensității proceselor biochimice ce au loc în timpul procesării.

Rezultatele experimentelor efectuate pe boabele de soia prelucrate biotehnologic prin germinare și fermentare lactică sunt redată în tabelul 3.14.

**Tabelul 3.14.** Variația azotului neproteic cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

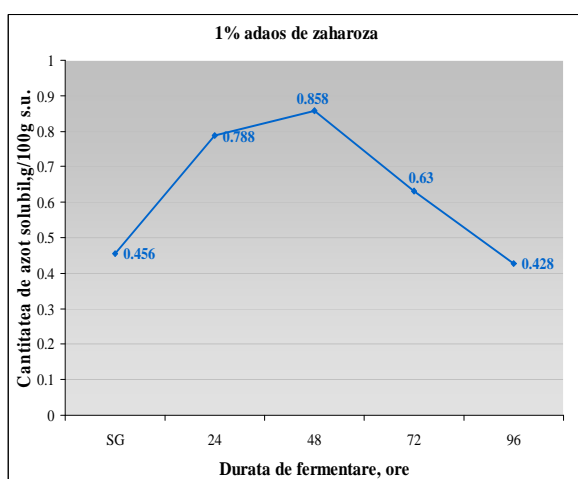
| Durata de prelucrare | Cantitatea de azot neproteic, g/100 g s.u. |                |                             |             |             |
|----------------------|--|----------------|-----------------------------|-------------|-------------|
|                      | Soia crudă                                 | Soia germinată | Soia fermentată             |             |             |
|                      |  |                | Concentrația de zaharoză, % |             |             |
|                      |  |                | 1%                          | 3%          | 5%          |
| 0                    | 0,208±0,003                                | -              | -                           | -           | -           |
| 4 zile               |  | 0,456±0,008    | -                           | -           | -           |
| 24 ore               | -  | -              | 0,788±0,007                 | 0,883±0,005 | 0,962±0,014 |
| 48 ore               | -  | -              | 0,858±0,003                 | 0,896±0,015 | 0,974±0,004 |
| 72 ore               | -  | -              | 0,630±0,004                 | 0,651±0,003 | 0,701±0,010 |
| 96 ore               | -  | -              | 0,428±0,005                 | 0,410±0,003 | 0,406±0,006 |

\* Valorile reprezintă media a trei determinări ± devierea standard

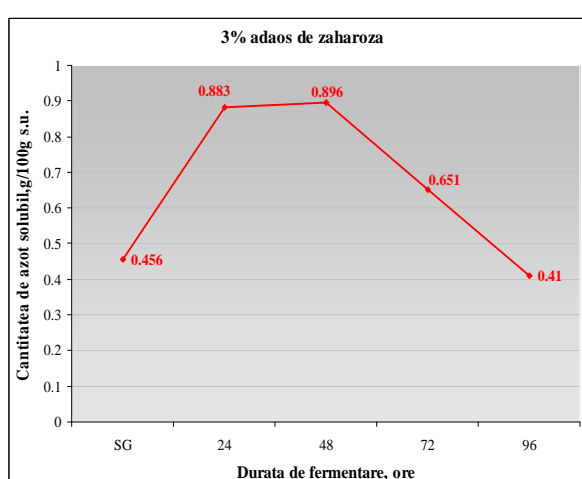
Analizând datele din tabelul 3.14, în boabele de soia germinate timp de 4 zile la 25°C cantitatea de azot solubil este de 0,456 g/100 g s.u., cu 119,23% mai mare decât în cel din boabele de soia ca atare, neprelucrate.

În figura 3.47 se poate observa creșterea bruscă a cantității de azot solubil în primele 24 ore comparativ cu cel din boabele de soia germinate timp de 4 zile la 25°C. Cantitatea de azot solubil crește de la 0,456 g N/100 g s.u. (în boabele germinate) cu 72,81% în boabele fermentate cu 1% adaos suplimentar de zaharoză, cu 93,64% în cele cu 3% zaharoză și cu 110,96% pentru cele fermentate în prezența unui mediu suplimentat cu 5% zaharoză.

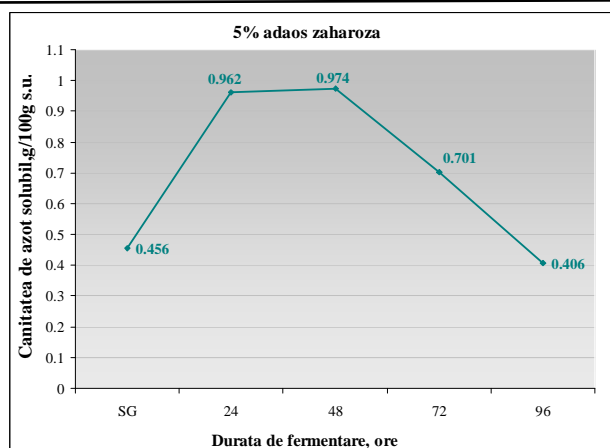
După încă 24 ore de fermentare, cantitatea de azot solubil din boabele de soia continuă să crească până la valori de 0,858gN /100g s.u., la 0,896 gN/100g s.u. și respectiv 0,974g N/100g s.u., funcție de aportul suplimentar de zaharoză din mediu (1, 3 și respectiv 5%).



a)



b)



c)

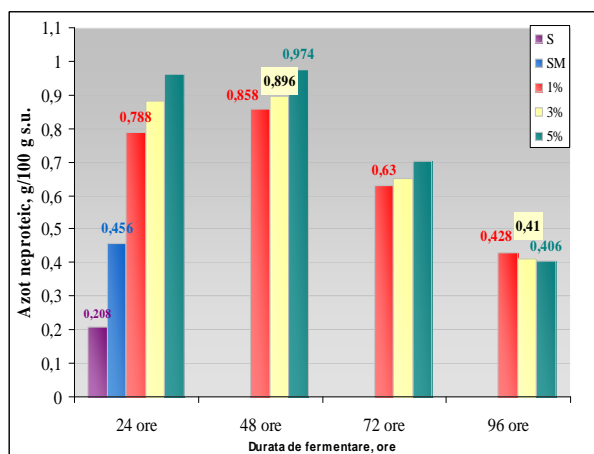
**Figura 3.47.** Evoluția nivelului de azot solubil cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată: a) 1%; b) 3%; c) 5%

Creșterea semnificativă a nivelului azotului solubil din boabele de soia germinate și fermentate se poate explica prin intensificarea proceselor de hidroliză a proteinelor, sub acțiunea proteazelor din bob în timpul germinării și al celor bacteriene la fermentație. Ca urmare a proteolizei, rezultă compuși cu azot solubili, ușor asimilabili care sunt utilizați de lactobacili ca sursă de azot pentru creștere.

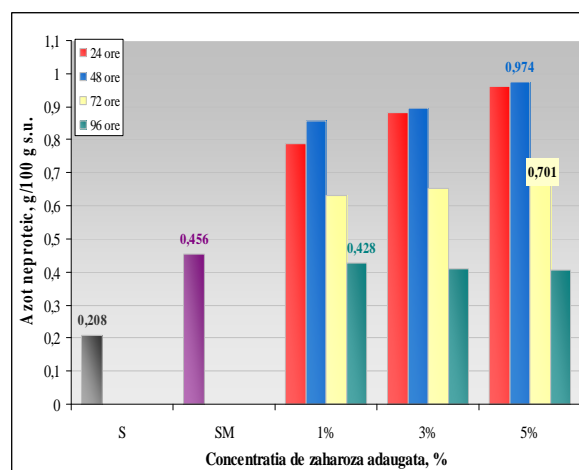
Continuarea procesului fermentativ timp de 72 ore determină scăderea cantității de azot solubil din boabe, cu 26,57% , 27,35% și 28,03% pentru probele fermentate cu 1, 3 și respectiv 5% (valorile sunt raportate la concentrația maximă corespunzătoare la 48 ore de fermentație).

Această scădere se poate datora consumului lor în timpul dezvoltării lactobacililor, știut fiind faptul că sursa de azot preferată a bacteriilor din genul *Lactobacillus* este azotul solubil (Dan, 1996).

În figurile 3.51 și 3.52 se observă că cea mai bună variantă de fermentare, în vederea obținerii unui nivel maxim al gradului de solubilizare a proteinelor (prin evaluarea azotului solubil) este germinarea urmată de fermentare timp de 48 ore, la concentrații ale zaharozei în mediul fermentativ de 5%.



a)



b)

**Figura 3.51.** Evoluția nivelului de azot neproteic cu cantitatea de zaharoză adăugată (a) și durata de fermentare (b)

Scăderea cantității de azot solubil în boabele de soia după 72, respectiv 96 ore de fermentare lactică se poate explica prin aceea că bacteriile lactice au nevoie de azotul neproteic ca factor de creștere; prin urmare, cu cât numărul bacteriilor lactice crește, cu atât cantitatea de azot neproteic scade, chiar dacă, per global cantitativ nivelul total de azot neproteic este mai mare decât cel din probele germinate. În plus, conform studiilor din literatură (Omafuvbe, 2007), în timpul fermentării, activitatea proteazică crește intens

în primele 48 ore, pentru ca apoi să scadă după această perioadă, determinând implicit o acumulare mai lentă a azotului solubil în boabele fermentate.

Cumulând aceste corelații, se poate justifica evoluția cantității de azot solubil în boabele de soia prelucrate biotehnologic prin germinarea timp de 4 zile la 25°C și fermentarea timp de 24, 48, 72 sau 96 ore într-un mediu fermentativ cu lactobacili, cu un nivel de zaharoză adăugat de 1, 3 sau 5%.

### 3.5.1.5.2. Evoluția azotului aminic

Aminoacizii reprezintă unitățile structurale de bază ale proteinelor, compuși macromoleculari a căror moleculă este alcătuită din resturi de  $\alpha$ -aminoacizi. Prin hidroliza enzimatică a proteinelor sub acțiunea proteazelor se obține un amestec de  $\alpha$ -aminoacizi.

Prin germinare și fermentație lactică procesele de hidroliză a proteinelor sunt intense, așa încât sub acțiunea proteazelor, substanțele proteice sunt degradate până la compuși simpli cu azot, aminoacizi și amoniac.

Evaluarea cantității de azot aminic reprezintă un indicator al gradului de hidroliză a proteinelor până la aminoacizi.

Rezultatele experimentelor efectuate pe boabele de soia prelucrate biotehnologic prin germinare și fermentare lactică sunt redată în tabelul 3.15 în funcție de durata de fermentare cât și de cantitatea de zaharoză adăugată în mediul fermentativ.

**Tabelul 3.15.** Variația azotului aminic cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

| Durata de prelucrare | Cantitatea de azot aminic, g/100 g s.u. |                |                             |             |             |
|----------------------|---|----------------|-----------------------------|-------------|-------------|
|                      | Soia crudă                              | Soia germinată | Soia fermentată             |             |             |
|                      |   |                | Concentrația de zaharoză, % |             |             |
|                      |   |                | 1%                          | 3%          | 5%          |
| 0                    | 0.227±0.013                             | -              | -                           | -           | -           |
| 4 zile               |   | 1.486±0.012    | -                           | -           | -           |
| 24 ore               | -                                       | -              | 2.026±0.010                 | 2.571±0.006 | 2.846±0.010 |
| 48 ore               | -                                       | -              | 3.073±0.008                 | 3.546±0.015 | 3.888±0.009 |
| 72 ore               | -                                       | -              | 3.822±0.006                 | 4.235±0.005 | 5.041±0.005 |
| 96 ore               | -                                       | -              | 3.426±0.012                 | 3.851±0.006 | 4.254±0.011 |

\* Valorile reprezintă media a trei determinări ± devierea standard

Din tabelul 3.15 se poate observa că în boabele de soia germinate timp de 4 zile la 25°C cantitatea de azot aminic este de 1,486 g/100 g s.u., de 6,55 ori mai mare decât cel din boabele crude de soia.

Prin germinare se activează proteazele din bobul de soia, ceea ce are ca efect intensificarea hidrolizei proteinelor și creșterea nivelului aminoacizilor, a peptidelor simple și a altor compuși neproteici cu azot.

Combinarea procesului germinativ al boabelor de soia cu un proces de fermentație lactică determină creșterea sensibilă a cantității de azot aminic cu durata de fermentare cât și cu cantitatea de zaharoză din mediul fermentativ.

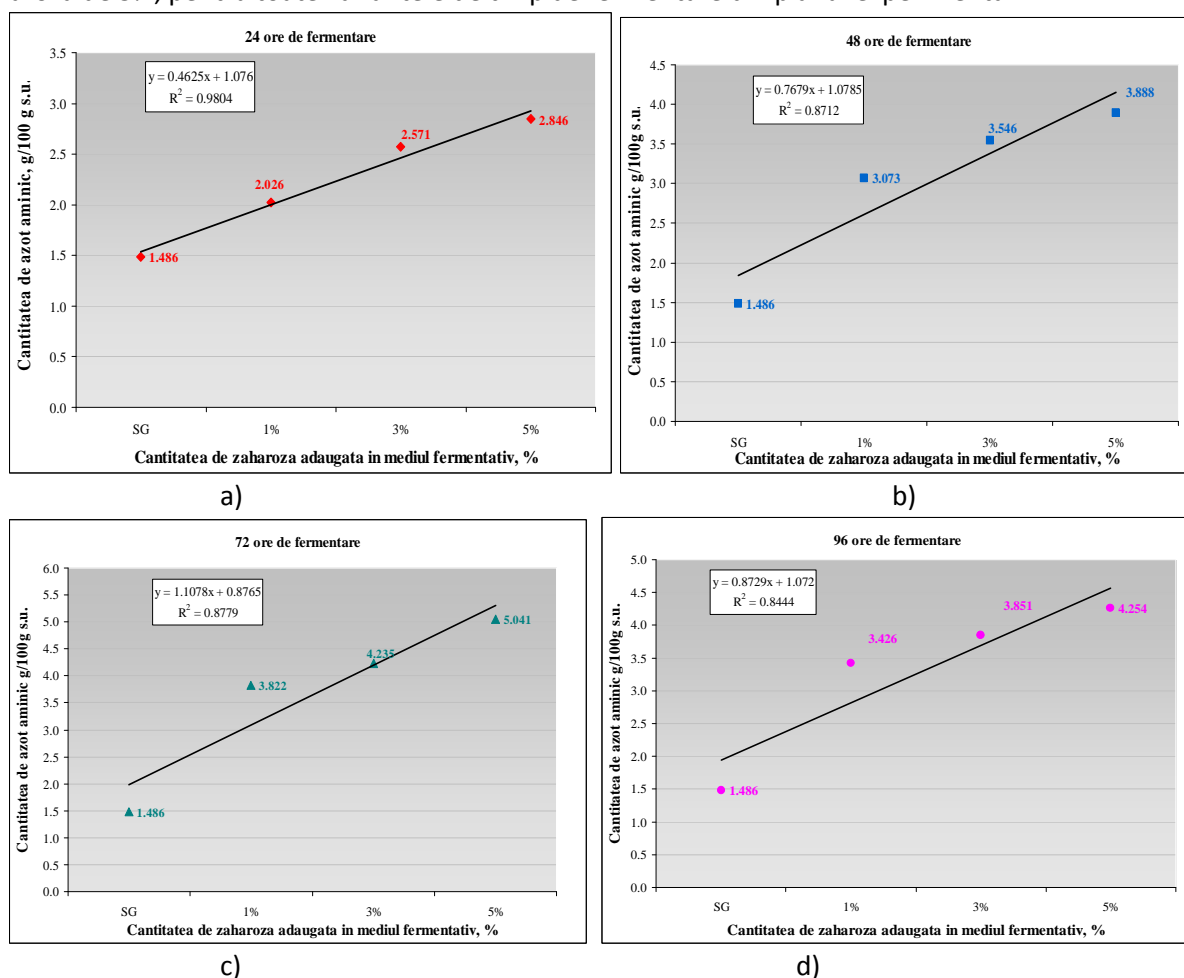
Astfel, în prima zi de fermentare a boabelor de soia cu 1% adaos de zaharoză, cantitatea de azot aminic atinge valori de 2,026 g/100 g s.u., cu 36,34% mai mari decât cele înregistrate în probele supuse doar germinării. Creșterea concentrației de aport suplimentar de zaharoză în mediul fermentativ, conduce la intensificarea acumulării aminoacizilor, proces cuantificat prin creșterea nivelului azotului aminic la 2,571g/100 g s.u. și 2,846 g/100 g s.u. pentru mediul cu 3, respectiv 5% zaharoză adăugată (figura 3.53 a).

După 72 ore de fermentare, cantitatea de azot aminic determinată în boabele de soia fermentate cu 1% zaharoză suplimentară a fost de 3,822 g/100 g s.u., cu 157,21% mai mare decât cea a boabelor germinate și a atins un maxim de 5,041 g/100 g s.u. în boabele fermentate aceeași perioadă dar cu 5% zaharoză adăugată.

În ultimele 24 ore de fermentare lactică, cantitativ nivelul aminoacizilor scade, ajungând după 96 ore de fermentare cu 5% zaharoză la valori de 4,254 g/100g s.u., deși nivelul acestora crește linear cu cantitatea de zaharoză și în această perioadă.

Creșterea cantității de azot aminic este liniară pentru toate perioadele de fermentare 24, 48, 72 și 96 ore astfel că prin analiza ecuațiilor dreptelor de regresie (figura 3.53), se observă că valoarea coeficientului de corelație  $R^2$  (pătratul coeficientului Pearson) este mai mare decât 0,84, ceea ce arată că modelul este bine definit la un prag de semnificație de 5% ( $p < 0,5$ ).

Cea mai mare creștere a azotului aminic a fost în boabele de soia fermentate cu un aport suplimentar de zaharoză de 5%, pentru toate variantele de timp de fermentare din planul experimental.



**Figura 3.53.** Evoluția nivelului de azot aminic cu cantitatea de zaharoză adăugată și durata de fermentare: a) 24 ore; b) 48 ore; c) 72 ore; d) 96 ore

Cea mai mare creștere a nivelului azotului aminic a fost de 239,23% față de mărtoșul germinat, fiind obținută prin combinarea germinării cu fermentația lactică timp de 72 ore cu 5% zaharoză. Și celelalte durate de timp au determinat creșteri semnificative ale cantității de azot aminic, față de germinare ca proces singular de prelucrare: 91,52% după 24 ore și 161,64% după 48 ore.

Influența adaosului de zaharoză este mai puțin importantă față de durata de fermentare, în sensul că se înregistrează creșteri apropiate procentual, comparativ cu probele mărtoș. Astfel, prin fermentarea timp de 72 ore cu 1% zaharoză se obține creșterea cantității de azot aminic cu 157,2% față de mărtoșul germinat, cu încă 27,80% pentru 3% și în final o creștere de încă 54,24% pentru 5% adaos de zaharoză a nivelului azotului aminic față de boabele germinate.

Scăderea cantității de azot aminic în boabele de soia în a patra zi de fermentare lactică se poate explica prin aceea că bacteriile lactice au nevoie de azot simplu, sub formă de aminoacizi ca factor de creștere și cu cât numărul bacteriilor lactice este mai mare și activitatea lor este mai intensă, cu atât cantitatea de azot aminic scade, chiar dacă, în final nivelul azotului aminic este superior celui din probele germinate.

**Aceste transformări ale compușilor cu azot demonstrează că proteinele soiei prelucrate prin germinare și fermentare lactică sunt mai ușor utilizate de organismul uman, gradul de asimilare fiind net îmbunătățit.**

### 3.5.1.6. Evoluția inhibitorului tripsinic

Determinarea activității reziduale a ureazei în boabele de soia este utilizată ca indicator pentru gradul de prelucrare a boabelor de soia, sub aspectul inactivării factorilor antinutriționali (ureaza are o rată de inactivare termică similară cu cea a inhibitorului tripsinic); cu cât activitatea ureazică este mai mare, cu atât nivelul factorilor antinutritivi, respectiv a inhibitorului tripsinic este mai mare (Krička, 2009).

În lucrarea de față s-a investigat efectul germinării și al fermentației lactice asupra activității ureazei (AU), ca metodă de evaluare a gradului de prelucrare a boabelor de soia.

Datele experimentale sunt redată sintetic în tabelul 3.16, în funcție de durata de fermentare (24, 48, 72 și 96 ore) și cantitatea de zaharoză adăugată suplimentar în mediul de fermentare (1, 3 și respectiv 5%).

**Tabelul 3.16.** Variația activității ureazice cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

| Durata de prelucrare | Activitatea ureazică, gN/g min. 30C |                |                             |             |             |
|----------------------|-------------------------------------|----------------|-----------------------------|-------------|-------------|
|                      | Soia crudă                          | Soia germinată | Soia fermentată             |             |             |
|                      |                                     |                | Concentrația de zaharoză, % |             |             |
|                      |                                     |                | 1%                          | 3%          | 5%          |
| 0                    | 2,073±0,036                         | -              | -                           | -           | -           |
| 4 zile               |                                     | 1,331±0,015    | -                           | -           | -           |
| 24 ore               | -                                   | -              | 1,107±0,012                 | 1,086±0,010 | 1,007±0,066 |
| 48 ore               | -                                   | -              | 1,044±0,023                 | 0,987±0,016 | 0,808±0,019 |
| 72 ore               | -                                   | -              | 0,546±0,009                 | 0,518±0,016 | 0,386±0,006 |
| 96 ore               | -                                   | -              | 0,392±0,005                 | 0,339±0,007 | 0,285±0,008 |

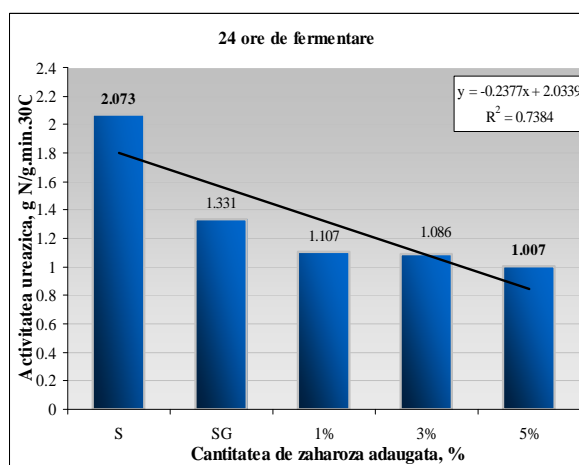
\* Valorile reprezintă media a trei determinări ± devierea standard

Se poate constata că germinarea boabelor de soia timp de 4 zile la 25°C este un procedeu eficient de reducere a inhibitorului tripsinic, valoarea activității ureazice scăzând cu 35,79%, de la 2,073 g N/g.min.30C la 1,331 g N/g.min.30C.

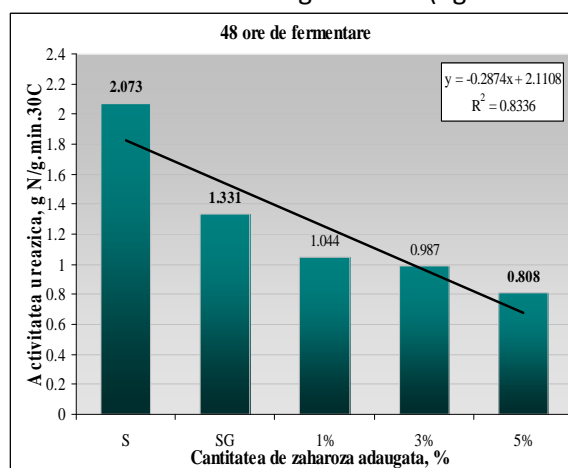
Germinarea îmbunătățește calitatea nutrițională a proteinelor din soia prin reducerea inhibitorului tripsinic datorită activității proteolitice. Activitatea proteazică a boabelor de soia este intensificată în timpul germinării, și determină hidroliza inhibitorului tripsinic deblocând tripsina, astfel încât proteinele pot fi digerate și utilizate de organism.

În experimentele efectuate am continuat germinarea cu fermentația lactică a boabelor de soia, iar prelucrarea aceasta suplimentară a condus la scăderea în continuare a activității ureazice (figura 3.59 a, b, c și d). S-a constatat că în primele 24 de ore de fermentare lactică, activitatea ureazică a avut o evoluție liniară descendentă pentru toate probele fermentate. Astfel, pentru boabele fermentate, comparativ cu cele germinate, scăderea activității ureazice a fost de 16,83% (pentru 1% zaharoză suplimentară în mediul fermentativ), 18,41% (pentru 3%) și 24,34% (pentru 5% aport suplimentar de zaharoză).

Continuarea fermentării timp de 48 ore duce la scăderea liniară a activității ureazice la valori de 0,808 g N/g.min.30C, o reducere cu 39,29% comparativ cu cea a boabelor de soia germinate (figura 3.59 b).

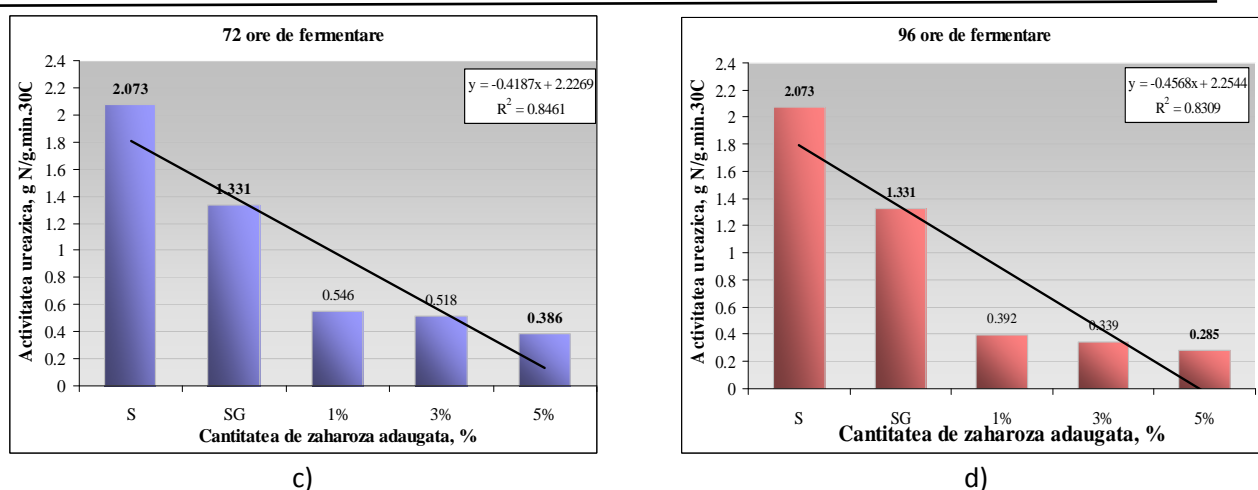


a)



b)





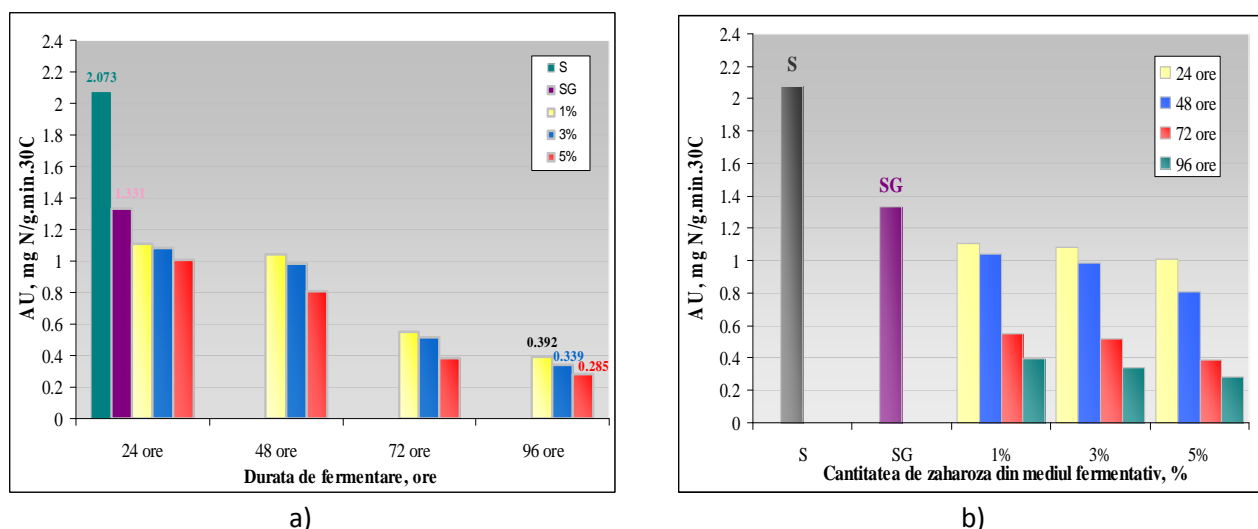
**Figura 3.59.** Evoluția activității ureazice cu cantitatea de zaharoză adăugată, funcție de durata de fermentare: a) 24 ore, b) 48 ore, c) 72 ore, d) 96 ore

Tendința se menține descrescătoare și prin prelungirea fermentației timp de 72 ore, când scăderea activității ureazice atinge valori de 0,546 g N/g.min.30C, cu 50,51% față de mărtoșul germinat pentru a atinge la finalul celor 96 ore de fermentare la o valoare de 0,392 g N/g.min.30C (figura 3.59 c, d).

Analizând ecuațiile dreptelor de regresie ale evoluției activității ureazice cu durata de fermentare se poate observa că valorile coeficienților  $R^2$  sunt mai mari de 0,68, ceea ce denotă o bună definire a modelului, la un nivel de semnificație de 5% ( $p < 0,5$ ).

Pentru același nivel al aportului de zaharoză (1%) activitatea ureazică scade cu creșterea duratei de fermentare: după 24 ore scăderea a fost de 17,45% față de boabele supuse doar germinării, după 48 ore a fost o scădere cu încă 4,7%, iar continuarea fermentației lactice pentru 72 și 96 ore a dus la creșterea diferenței procentuale față de 24 ore, cu 33,06%, respectiv 53,32%.

În figura 3.63 sunt reprezentate valorile activității ureazice în funcție de durata de fermentare, respectiv cantitatea de zaharoză adăugată în mediul de fermentare lactic.



**Figura 3.63.** Evoluția activității ureazice: a) cu durata de fermentare, b) cu cantitatea de zaharoză adăugată în mediul fermentativ

Prin germinare se înregistrează o reducere semnificativă a activității ureazice (35,79%) comparativ cu mărtoșul, iar completarea acestuia cu fermentația lactică determină scăderea nivelului activității ureazice cu 78,58% față de probele germinate și cu un total de 86,25% față de probele neprelucrate prin nici un procedeu.

Reducerea inhibitorului tripsinic prin germinare urmată de fermentație lactică se poate explica prin creșterea activității proteazelor proprii boabelor de soia, ale tărâțelor de grâu din care s-a obținut mediul

fermentativ, precum și cele proprii bacteriilor lactice din genul *Lactobacillus*. Proteazele determină hidroliza inhibitorului tripsinic care nu mai poate bloca tripsina, ce devine liberă și aptă de a hidroliza proteinele, ceea ce duce în mod consecutiv la îmbunătățirea digestibilității proteinelor.

#### Concluzii parțiale:

☞ Germinarea boabelor de soia timp de 24 ore la 25°C determină o bună reducere a activității ureazei (35,79%), care este însă mai mică decât reducerea de 85% obținută prin tratamente termice de procesare (Dikshit, 2003).

☞ Modificarea nivelului de zaharoză din mediul de fermentație lactică nu influențează în mare măsură activitatea ureazică a boabelor de soia germinate și fermentate, dar creșterea duratei de fermentare este mai eficientă pentru îmbunătățirea calităților nutriționale ale boabelor de soia.

☞ Încercarea noastră de a combina germinarea cu fermentarea lactică pentru a obține o reducere mai bună a activității ureazice a fost eficientă; rezultatele au arătat că procesarea biotehnologică dublă a determinat scăderea activității ureazice față de boabele neprelucrate cu până la 86,26% (după 72 și 96 ore de fermentare), valori similare celor obținute prin procesările termice;

☞ Avantajul utilizării acestor două metode combinate pentru reducerea activității inhibitorului tripsinic este acela că sunt protectoare față de ceilalți compuși bioactivi ai boabelor de soia (vitamine, factori antioxidanți, minerale solubile).

#### 3.5.1.7. Evoluția nivelului de fosfor anorganic

În timpul dezvoltării plantei, fosforul este depozitat în boabele de soia sub forma acidului fitic, principala rezervă de fosfor a acesteia. Acidul fitic este un agent puternic de chelare, încărcat pozitiv, se leagă ușor de minerale și proteine determinând reducerea biodisponibilității acestora pentru organismul uman; fitații reprezintă circa 65-85% din fosforul total al boabelor de soia (Coelho, 2007).

Germinarea conduce la scăderea drastică a nivelului fitaților din boabele de soia (cu 38,85%), iar fermentarea determină o scădere de 32,3% a cantității de fitați (Chitra, 1993).

Hidroliza fitaților determină acumularea de fosfor anorganic în boabele de soia, cei doi parametri fiind invers proporțional corelați.

În lucrarea de față s-a investigat nivelul cantității de fosfor anorganic al boabelor de soia germinate timp de 4 zile la 25°C și evoluția acestui parametru pe parcursul fermentării lor lactice timp de 24, 48, 72 și 96 ore într-un mediu cu 1, 3, respectiv 5% zaharoză adăugată suplimentar; rezultatele experimentelor conduse sunt redate în tabelul 3.17.

**Tabelul 3.16.** Variația nivelului de fosfor anorganic cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

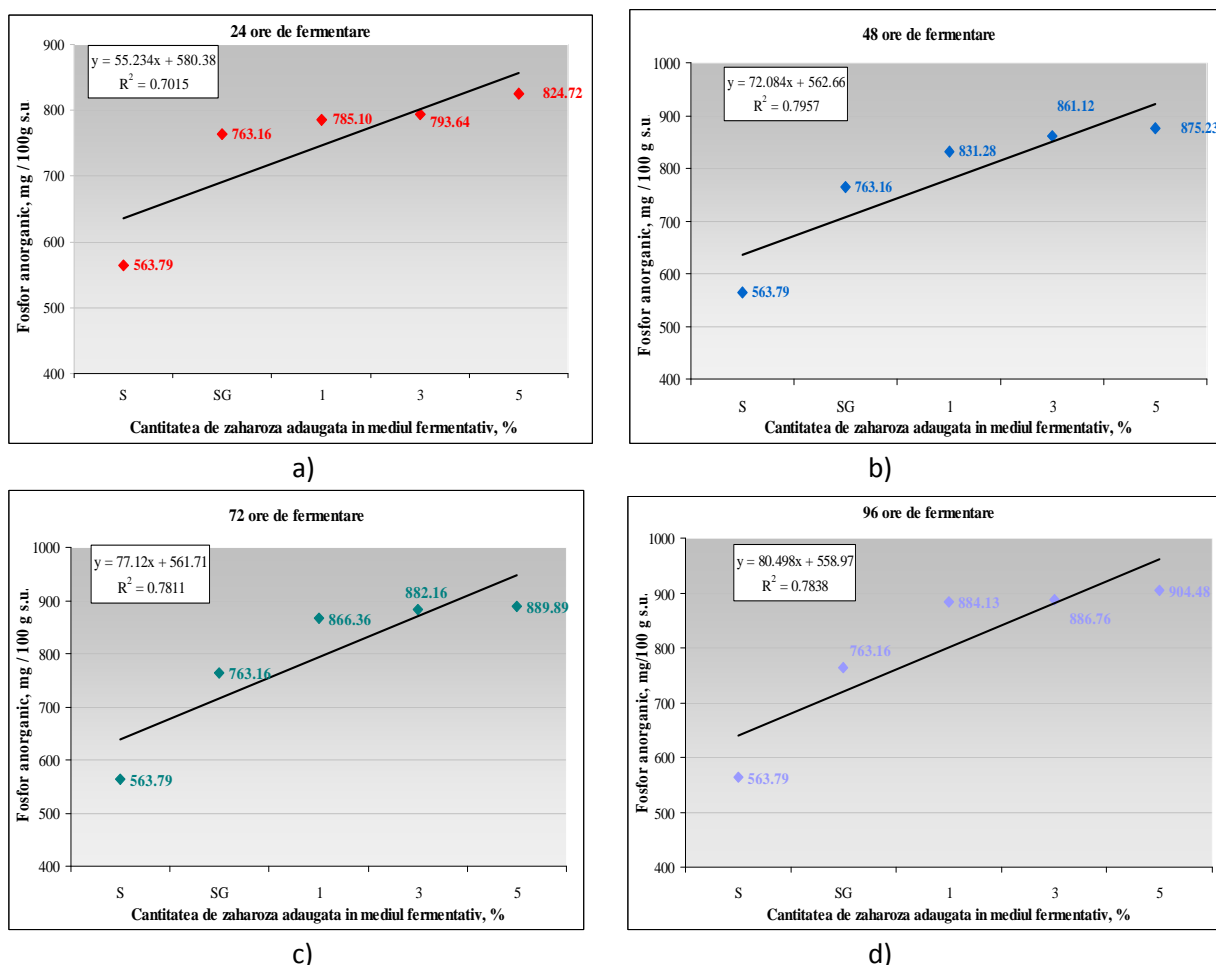
| Durata de prelucrare | Cantitatea de fosfor anorganic, mg/100 g s.u. |                |                             |             |             |
|----------------------|---|----------------|-----------------------------|-------------|-------------|
|                      | Soia crudă                                    | Soia germinată | Soia fermentată             |             |             |
|                      |   |                | Concentrația de zaharoză, % |             |             |
|                      |   |                | 1%                          | 3%          | 5%          |
| 0                    | 563,79±3,04                                   | -              | -                           | -           | -           |
| 4 zile               |   | 763,16±4,39    | -                           | -           | -           |
| 24 ore               | -   | -              | 785,1±3,61                  | 793,64±3,72 | 824,72±8,55 |
| 48 ore               | -   | -              | 831,28±3,80                 | 861,12±3,61 | 875,23±4,49 |
| 72 ore               | -   | -              | 866,36±3,81                 | 882,16±4,52 | 889,89±8,37 |
| 96 ore               | -   | -              | 884,13±4,39                 | 886,76±5,29 | 904,48±6,13 |

\* Valorile reprezintă media a trei determinări ± devierea standard

Pentru o observare mai bună a evoluției cantității de fosfor anorganic în urma procesărilor biotehnologice, au fost reprezentate datele grafic, cu durata de fermentare și cu cantitatea de zaharoză adăugată suplimentar în mediul fermentativ cu bacterii lactice.

Din figura 3.65 se poate observa că germinarea, ca proces unic de prelucrare a boabelor de soia determină o creștere substanțială a nivelului fosforului anorganic din bob.

Astfel, după 4 zile de germinare la 25°C, cantitatea de fosfor anorganic crește de la 563,79 mg/100 g s.u. în boabele neprelucrate la 763,16 mg/100 g s.u. în boabele germinate, o creștere procentuală de 35,36%.



**Figura 3.65.** Evoluția nivelului de fosfor anorganic cu cantitatea de zaharoză adăugată și durata de fermentare: a) 24 ore; b) 48 ore; c) 72 ore; d) 96 ore

Cantitatea de fosfor din boabele fermentate cu 5% zaharoză suplimentar, crește liniar de la 824,72 mg/100 g s.u. pentru probele fermentate 24 ore, la până la 904,48 mg/100 g s.u. după 96 ore de fermentare în aceleași condiții (figura 3.65)

Creșterile procentuale de la o zi la alta de fermentare nu sunt mai mari de 2,2%, ceea ce arată că fermentarea nu aduce un surplus semnificativ de fosfor anorganic în boabele de soia. Acest fapt se poate datora unei activități mai reduse a fitazei din mediul fermentativ, comparativ cu cea activată la germinare, unde creșterea cantității de fosfor anorganic a fost importantă. Este posibil și un consum al fosforului eliberat determinat de multiplicarea celulară a bacteriilor.

Analizând ecuațiile dreptelor de regresie ale evoluției fosforului anorganic cu durata de fermentare se poate observa că valorile coeficienților  $R^2$  sunt mai mari de 0,7, ceea ce denotă o bună definire a modelului, la un nivel de semnificație de 5% ( $p < 0,5$ ).

Fermentația lactică determină o creștere suplimentară a nivelului de fosfor anorganic, dar măsura în care acesta crește este mai redusă față de cea indusă de germinare.

### 3.5.1.8. Conținutul mineralelelor ușor asimilabile

Biodisponibilitatea mineralelor din soia este redusă de prezența simultană a acidului fitic cu care formează fitați, compuși insolubili în tractul gastrointestinal. Fitații complexează ionii de calciu, magneziu, fier, zinc, micșorând în acest fel posibilitatea organismului de a beneficia de aportul lor în dietele pe bază de soia.

Germinarea determină activarea fitazei, determinând indirect creșterea gradul de biodisponibilizare a mineralelor. Este posibilă și o influență a bacteriilor lactice asupra biodisponibilității mineralelor.

Există studii care au arătat că nivelul de minerale totale nu diferă semnificativ prin germinare și fermentare, ci doar gradul în care se solubilizează acestea prin prelucrările biotehnologice (Khalid, 2009, Duhan, 2002, Yagoub, 2008, Oboh, 2006 și 2000).

Pornind de la această afirmație demonstrată de studiile experimentale din literatura de specialitate, în lucrarea de față s-a determinat nivelul mineralelor totale din boabele crude, iar rezultatele sunt redată în tabelul 3.18.

**Tabelul 3.18.** Cantitatea de minerale totale din boabele de soia crude și germinate\*

| Tipul de boabe | Cantitatea de minerale totale, mg/100 g s.u. |            |              |             |
|----------------|--|------------|--------------|-------------|
|                | Calciu                                       | Fier       | Magneziu     | Zinc        |
| Soia crudă     | 341,26±0,012                                 | 8,41±0,003 | 238,15±0,038 | 2,185±0,004 |

\* Valorile reprezintă media a trei determinări ± devierea standard

#### 3.5.1.8.1. Calciul solubil (Ca<sup>2+</sup>)

În tabelul 3.19 sunt redată valorile nivelului de calciu solubil în funcție de durata de fermentare și de cantitatea de zaharoză adăugată în mediul fermentativ.

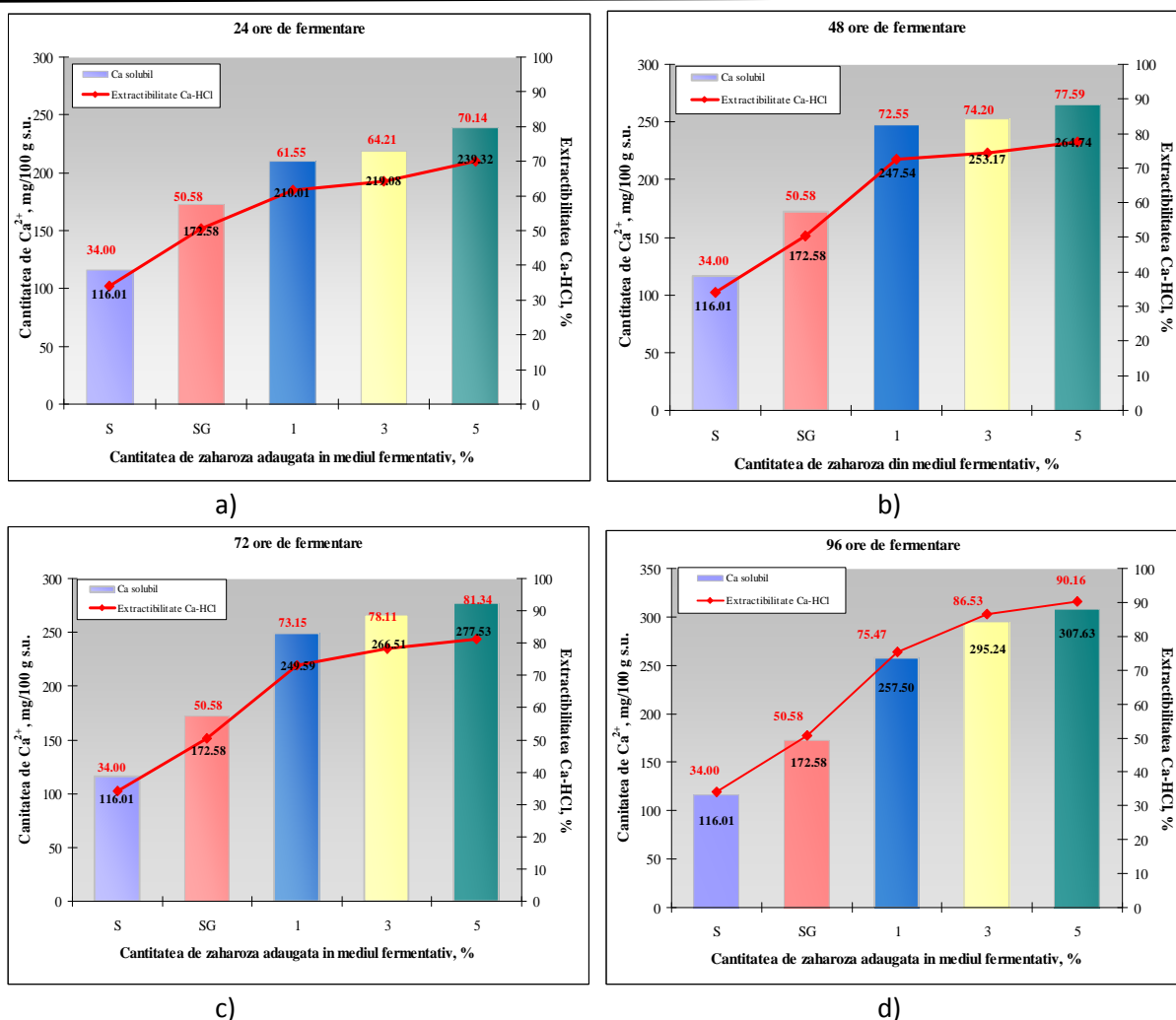
**Tabelul 3.19.** Variația Ca solubil cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

| Durata de prelucrare | Cantitatea de Ca solubil, mg/100 g s.u. |                |                             |              |              |
|----------------------|---|----------------|-----------------------------|--------------|--------------|
|                      | Soia crudă                              | Soia germinată | Soia fermentată             |              |              |
|                      |   |                | Concentrația de zaharoză, % |              |              |
|                      |   |                | 1%                          | 3%           | 5%           |
| 0                    | 116,01±0,457                            | -              | -                           | -            | -            |
| 4 zile               |   | 172,58±0,450   | -                           | -            | -            |
| 24 ore               | -                                       | -              | 210,01±0,526                | 219,08±0,296 | 239,32±0,397 |
| 48 ore               | -                                       | -              | 247,54±0,476                | 253,17±1,925 | 264,74±1,591 |
| 72 ore               | -                                       | -              | 249,59±0,27                 | 266,51±1,01  | 277,53±1,42  |
| 96 ore               | -                                       | -              | 257,5±0,691                 | 295,24±1,469 | 307,63±1,180 |

\* Valorile reprezintă media a trei determinări ± devierea standard

Rezultatele sunt prezentate și grafic, prin ilustrarea evoluției cantitative a nivelului de Ca solubil, cât și al extractibilității Ca în HCl (ca procent al Ca solubil din Ca total), considerând cantitatea de calciu total din tabelul 3.18.

Cantitatea de calciu solubil din boabele de soia neprelucrate este de 116,01mg/100g s.u., ceea ce corespunde unui grad de extractibilitate de 34%. Prin germinarea timp de 4 zile la 25°C, nivelul Ca solubil ajunge la 172,58mg/100 g s.u., cu 48,76% mai mare față de cel înregistrat în boabele negerminate, iar extractibilitatea în HCl atinge valoarea de 50,58% (figura 3.69).



**Figura 3.69.** Evoluția nivelului de calciu solubil cu cantitatea de zaharoză adăugată și durata de fermentare: a) 24 ore; b) 48 ore; c) 72 ore; d) 96 ore

Fermentarea boabelor de soia germinate cu un adaos suplimentar de zaharoză de 1% în mediul de fermentare conduce la creșterea nivelului de calciu solubil, în funcție de durata de fermentare. Astfel, după 24 ore creșterea  $Ca^{2+}$  este cu 21,69% (figura 3.69 a), după 48 ore cu 43,43% (figura 3.69 b), după 72 ore cu 44,62% (figura 3.69 c), iar după 4 zile de fermentare, creșterea e cu 49,21% (figura 3.69 d), față de probele martor (germinate 4 zile la 25°C).

Extractibilitatea calciului în HCl este definită ca procentul din Ca total care se solubilizează în HCl 0,03N și este utilizată pentru a estima gradul de biodisponibilizare a acestui mineral prin cele două procedee biotehnologice de prelucrare. Această biodisponibilizare crește o dată cu durata de fermentare; după 24 ore de fermentare, se extrage 70,14% din nivelul total de calciu, după 48 ore 77,59% din Ca trece în soluția de HCl, pentru ca după 96 ore gradul de extractibilitate și implicit de biodisponibilizare a Ca să ajungă la 90,16% (toate aceste valori fiind înregistrate pentru probele fermentate cu 5% adaos exogen de zaharoză în mediul de fermentare) (figura 3.69).

Cea mai mare creștere a gradului de biodisponibilizare a fost înregistrată pentru probele germinate și fermentate 96 ore cu 5% zaharoză când nivelul Ca solubil în HCl a crescut cu 78,25% comparativ cu martorul (boabele germinate).

Se poate conchide analizând datele că adăugarea unei cantități de zaharoză de 3% respectiv 5% în mediul fermentativ duce la identificarea unor cantități mari de calciu solubil în probele prelucrate, pentru toate duratele de fermentare la care au fost menținute boabele de soia; prin această combinație a parametrilor de fermentare, se ajunge după 96 ore de fermentare la un nivel maxim al Ca solubil de 307,63mg/100 g s.u., cu 78,25% mai mare decât cel determinat pentru probele supuse doar germinării.

3.5.1.8.2. Fierul absorbabil ( $\text{Fe}^{2+}$ )

În lucrarea de față am investigat influența germinării și a fermentației lactice asupra gradului de biodisponibilizare a fierului.

Rezultatele sunt redată tabelat (tabelul 3.20) și grafic prin analiza evoluției cantității de fier solubil cât și a extractibilității lui în HCl 0,03N în funcție de durata de fermentare (24, 48, 72 și 96 ore) și nivelul de zaharoză adăugat în mediul fermentativ (1, 3, 5%).

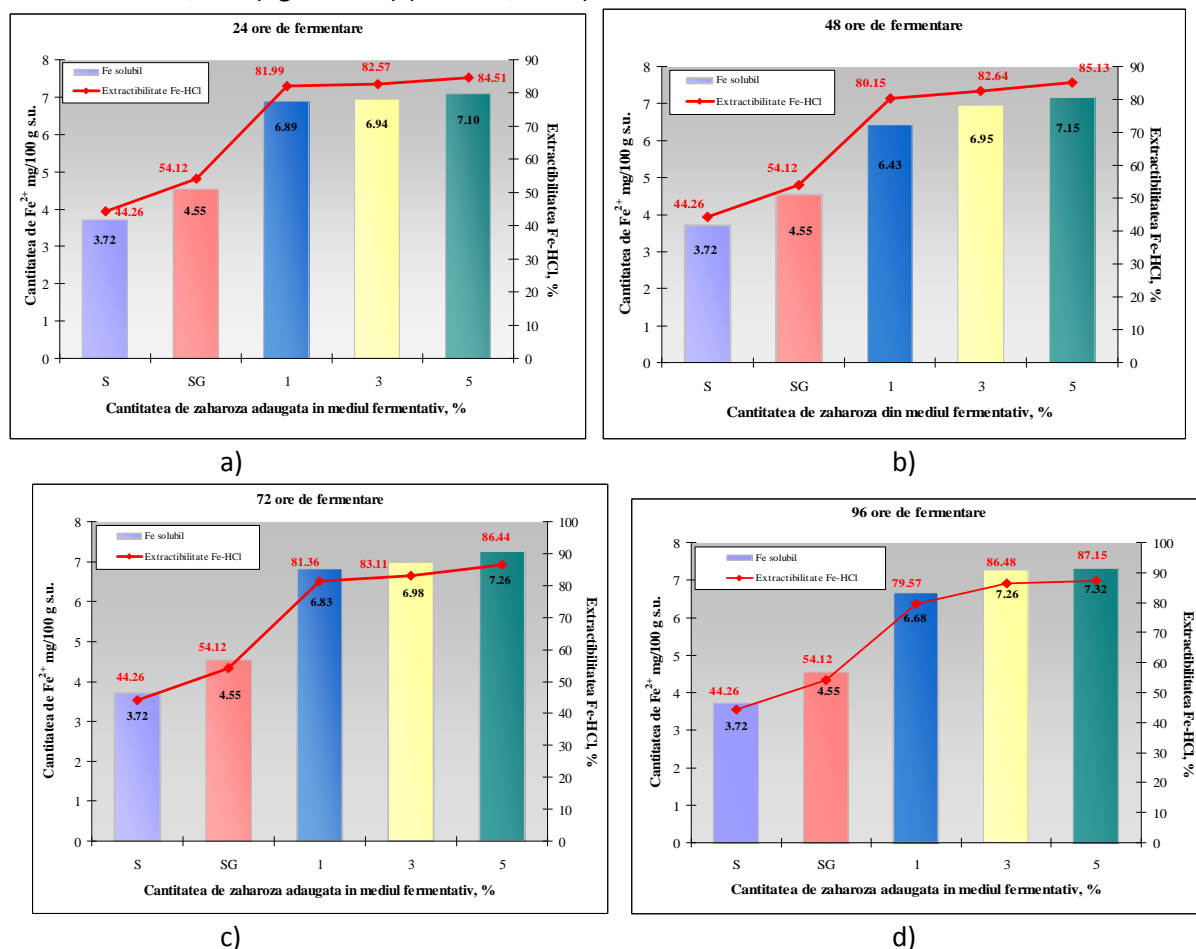
**Tabelul 3.20.** Variația Fe solubil cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

| Durata de prelucrare | Cantitatea de Fe solubil, mg/100 g s.u.. |                |                             |            |            |
|----------------------|--|----------------|-----------------------------|------------|------------|
|                      | Soia crudă                               | Soia germinată | Soia fermentată             |            |            |
|                      |  |                | Concentrația de zaharoză, % |            |            |
|                      |  |                | 1%                          | 3%         | 5%         |
| 0                    | 3,72±0,006                               | -              | -                           | -          | -          |
| 4 zile               | -  | 4,55±0,036     | -                           | -          | -          |
| 24 ore               | -  | -              | 6,89±0,075                  | 6,94±0,062 | 7,10±0,072 |
| 48 ore               | -  | -              | 6,43±0,044                  | 6,95±0,084 | 7,15±0,047 |
| 72 ore               | -  | -              | 6,83±0,045                  | 6,98±0,079 | 7,26±0,073 |
| 96 ore               | -  | -              | 6,68±0,059                  | 7,26±0,074 | 7,32±0,075 |

\*Valorile reprezintă media a trei determinări ± devierea standard

Cantitatea de fier solubil din boabele de soia neprelucrate este de 3,72 mg/100 g s.u., ceea ce reprezintă un grad de extractibilitate de 44,26% (luând raportat la fierul total de 8,41 mg/100 g s.u., din tabelul 3.18).

Prelucrarea boabelor de soia prin germinare (4 zile/25°C), conduce la creșterea nivelului Fe solubil până la 4,55 mg/100 g s.u., cu 22,31% mai mult decât în boabele negerminate; extractibilitatea Fe în HCl atinge valoarea de 54,12% (figura 3.75) (Bahaciu, 2003).



**Figura 3.75.** Evoluția nivelului de fier solubil cu cantitatea de zaharoză adăugată și durata de fermentare: a) 24 ore; b) 48 ore; c) 72 ore; d) 96 ore

Completarea germinării ca proces biotehnologic cu fermentarea boabelor de soia și utilizarea unui adaos suplimentar de zaharoză în mediul de fermentare conduce la creșterea nivelului de fier solubil din boabe. Cea mai mare creștere a fierului solubil se înregistrează pentru primele 24 ore de fermentare, când modificările au fost cu 51,43% mai mari pentru probele cu 1% zaharoză adăugată suplimentar și cu 52,53% și 56,04% pentru 3 și respectiv 5% zaharoză adăugată în mediul fermentativ (figurii 3.75).

Creșterea duratei de fermentare nu aduce modificări mari în cantitatea de fier solubil a boabelor de soia prelucrate, aceasta ajungând la valori de 7,32 mg/100 g s.u. pentru probele germinate și fermentate 96 ore, ceea ce reprezintă cu 60,88% mai mult decât cea din proba martor, germinată.

Este interesant de observat că valoarea cantității de fier solubil din boabele de soia germinate și fermentate 72 ore cu 5% zaharoză este egală cu cea a probelor fermentate cu 3% zaharoză timp de 96 ore.

**Așadar, creșterea nivelului de zaharoză din mediul fermentativ cu 2% reduce durata de fermentare cu 24 ore, în sensul obținerii aceleiași cantități de fier absorbabil, respectiv 7,26 mg/100 g s.u.**

În ceea ce privește biodisponibilizarea fierului, exprimată ca raportul dintre cantitatea de fier extrasă în HCl 0,03N și cantitatea de fier total (tabelul 3.18) din boabe, aceasta are de asemenea o evoluție ascendentă, de la 84,51% pentru boabele germinate și fermentate 24 ore cu 5% zaharoză la 87,15 % pentru cele germinate și fermentate 96 ore cu 5% (figura 3.75).

Nu există o mare diferență între durata și cantitatea de zaharoză adăugată la fermentare, sub aspectul creșterii procentuale a biodisponibilizării fierului, comparativ cu martorul (boabe de soia supuse doar germinării). Astfel, creșterile variază de la valori mai mari decât martorul cu 56,04% (pentru probele F24-5) până la valori mai mari cu 60,88% (pentru probele F96-5).

Mărirea procentului de zaharoză din mediul fermentativ nu determină o creștere importantă a biodisponibilizării fierului în boabele de soia, nivelul maxim al valorii fierului solubil este de 7,32mg/100 g s.u., cu doar 0,82% mai mare decât valoarea aceluiași parametru determinat în boabele de soia germinate și fermentate 72 ore cu 5% zaharoză.

Germinarea este un proces caracterizat de o serie importantă de modificări biochimice dintre care activarea fitazei este unul important pentru că determină scindarea legăturilor create între acidul fitic și mineralele. Ca urmare a acțiunii acestei enzime crește nivelul mineralelor solubile și scade cel al fitaților (Bau, 2000).

### 3.5.1.8.3. Magneziul solubil (Mg<sup>2+</sup>)

Magneziul este activator a numeroase sisteme enzimatic, în special al celor care transferă resturile de acid fosforic, în particular în contracția musculară, fiind un modulator al excitabilității neuromusculare. Magneziul joacă un rol important în reglarea sintezei acizilor nucleici și a unor procese anabolice și catabolice din organism (Segal, 2006).

**Tabelul 3.21.** Variația Mg solubil cu durata de fermentare și zaharoza adăugată\*

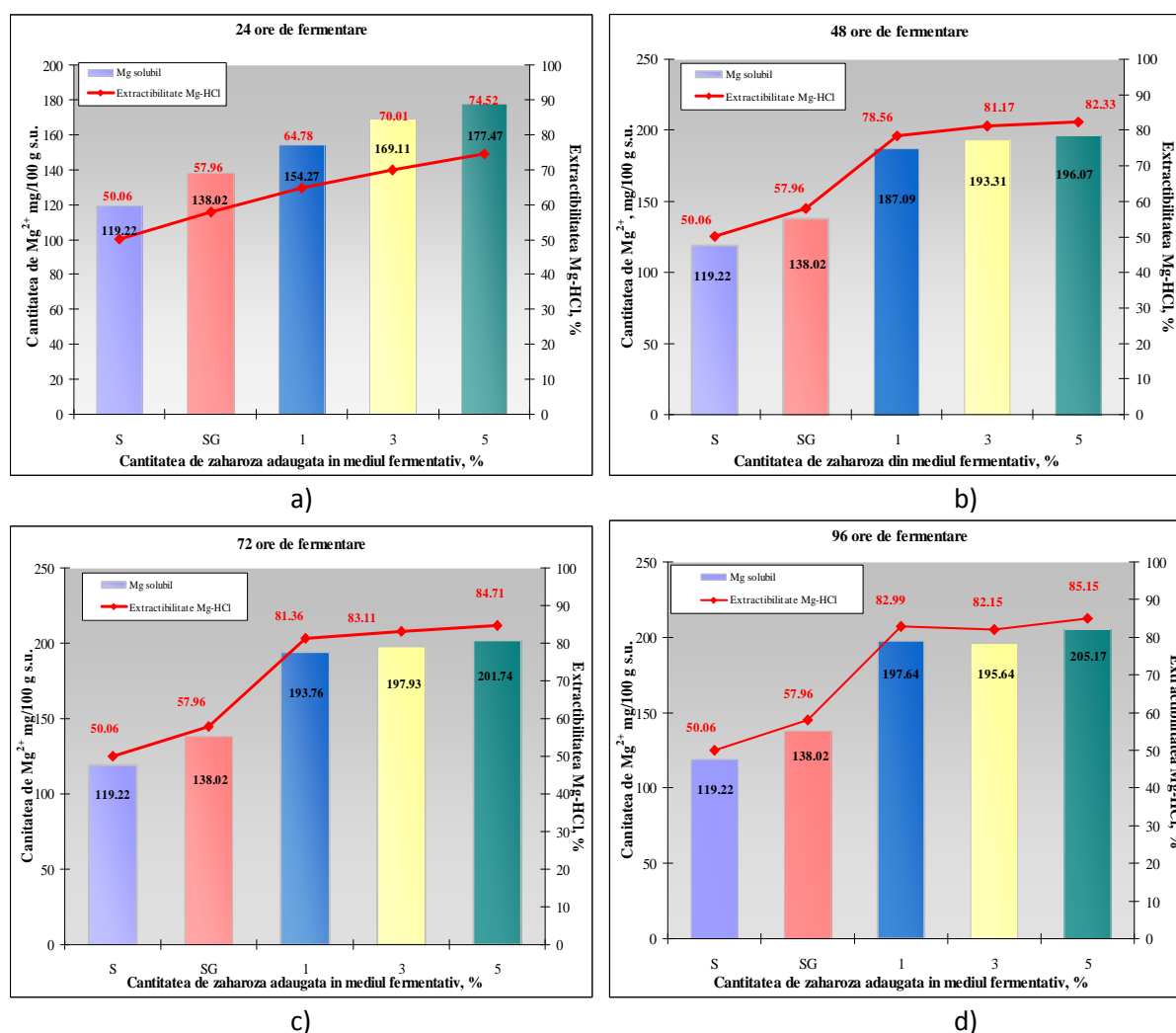
| Durata de prelucrare | Cantitatea de Mg solubil, mg/100 g s.u. |                |                             |              |              |
|----------------------|---|----------------|-----------------------------|--------------|--------------|
|                      | Soia crudă                              | Soia germinată | Soia fermentată             |              |              |
|                      |   |                | Concentrația de zaharoză, % |              |              |
|                      |   |                | 1%                          | 3%           | 5%           |
| 0                    | 119,22±0,450                            | -              | -                           | -            | -            |
| 4 zile               |   | 138,02±0,658   | -                           | -            | -            |
| 24 ore               | -                                       | -              | 154,27±0,146                | 169,11±0,255 | 177,47±0,798 |
| 48 ore               | -                                       | -              | 187,09±0,516                | 193,31±0,500 | 196,07±0,923 |
| 72 ore               | -                                       | -              | 193,76±0,750                | 197,93±0,688 | 201,74±0,636 |
| 96 ore               | -                                       | -              | 197,64±0,411                | 195,64±0,748 | 205,17±1,281 |

\* Valorile reprezintă media a trei determinări ± devierea standard

Din datele obținute experimental și redate în figura 3.81, în boabele de soia cantitatea de magneziu solubil este de 119,22 mg/100 g s.u., iar gradul său de extractibilitate în HCl 0,03N (implicit

biodisponibilitatea) este de 50,06%. Aceasta a fost exprimată prin raportarea la nivelul de magneziu total, 238,15mg/100 g s.u. (tabelul 3.18).

Prin germinarea timp de 4 zile la 25°C, extractibilitatea în HCl a magneziului crește la 57,96%. Gradul de biodisponibilizare a magneziului este îmbunătățit prin continuarea germinării cu fermentația lactică, în condițiile adaosului suplimentar de zaharoză de 1, 3 sau 5% timp de 24, 48, 72 și 96 ore.



**Figura 3.81.** Evoluția nivelului de magneziu solubil cu cantitatea de zaharoză adăugată și durata de fermentare: a) 24 ore; b) 48 ore; c) 72 ore; d) 96 ore

În primele 24 de ore ale fermentației, evoluția extractibilității în HCl a magneziului este ascendentă, crescând o dată cu cantitatea de zaharoză adăugată în mediul de fermentare de la 64,78% pentru boabele de soia germinate și fermentate cu 1%, la 70,01% pentru cele cu adaos de 3% și în final la 74,52% pentru cele în care mediul fermentativ a fost suplimentat cu 5% zaharoză (figura 3.81 a). Valoarea cantității de magneziu variază de la 154,27 mg/100 g s.u. în boabele fermentate cu 1% zaharoză până la 177,47mg/100 g s.u. în probele fermentate cu 5% aport de zaharoză.

După 48 de ore de fermentare, extractibilitatea magneziului în HCl ajunge la 82,33% pentru probele fermentate cu 5% adaos zaharoză, pentru ca în finalul experimentului, după 96 ore de fermentare gradul de biodisponibilizare a magneziului să fie de 74,57%, 82,15% și respectiv 85,15% în cazul fermentării cu adaos de zaharoză de 1, 3, respectiv 5%.

Nivelul Mg solubil din boabele de soia fermentate timp de 48 ore variază de la 187,09 mg/100 g s.u. la 196,07mg/100 g s.u. în probele cu 3, respectiv 5% adaos suplimentar de zaharoză.

Datele din figura 3.81 redau faptul că cele mai bune condiții de prelucrare biotehnologică complexă a boabelor de soia germinate timp de 4 zile la 25°C cu scopul îmbunătățirii gradului de extractibilitate a magneziului este fermentația lactică timp de 72 ore cu 3% sau 5% adaos zahăr fermentescibil, condiții în



care biodisponibilitatea magneziului este de 83,11, respectiv 84,71%. Mărirea duratei de fermentare nu mai modifică semnificativ cantitatea de magneziu solubil din boabele de soia.

Pentru un adaos de 5% zaharoză nivelul Mg solubil crește mai mult pentru probele fermentate 96 ore (cu 42,06% mai mult față de martorul germinat) decât cele fermentate 72 ore, cu același adaos (creștere cu 40,06% față de boabele germinate).

Germinarea și fermentația lactică sunt procese biotehnologice prin care este activată fitaza (fie proprie boabelor de soia, fie din tărâțele utilizate pentru extractul fermentativ, sau chiar proprii bacteriilor lactice). Astfel ar putea fi explicată creșterea semnificativă a gradului de solubilizare și biodisponibilizare a mineralelor din boabele de soia, prin combinarea celor două procedee biotehnologice de prelucrare (Eltayeb, 2008, Odumodu, 2010).

#### 3.5.1.8.4. Nivelul de zinc solubil (Zn<sup>2+</sup>)

Zincul este prezent într-o serie de metalenzime, fiind implicat în digestie, metabolism și are un rol specific în metabolismul acizilor grași esențiali. Deprivarea de zinc are consecințe asupra digestibilității hranei și în special influențează negativ absorbția și metabolismul protidic, sinteza ADN-ului, a colagenului, având efect negativ asupra parametrilor imunologici și a dezvoltării oaselor.

Zincul influențează capacitatea de învățare și comportamentul individului, este implicat în dezvoltarea sexuală; statutul zincului are relații multiple cu diferiți hormoni influențând și concentrația de colesterol (Segal, 2006). Cantitatea de Zn determinată experimental este redată în tabelul 3.22.

**Tabelul 3.22.** Variația Zn solubil cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

| Durata de prelucrare | Cantitatea de Zn solubil, mg/100 g s.u. |                |                             |            |            |
|----------------------|---|----------------|-----------------------------|------------|------------|
|                      | Soia crudă                              | Soia germinată | Soia fermentată             |            |            |
|                      |   |                | Concentrația de zaharoză, % |            |            |
|                      |   |                | 1%                          | 3%         | 5%         |
| 0                    | 1,07±0,007                              | -              | -                           | -          | -          |
| 4 zile               | -                                       | 1,37±0,003     | -                           | -          | -          |
| 24 ore               | -                                       | -              | 1,56±0,038                  | 1,59±0,010 | 1,68±0,013 |
| 48 ore               | -                                       | -              | 1,58±0,007                  | 1,62±0,014 | 1,70±0,005 |
| 72 ore               | -                                       | -              | 1,78±0,011                  | 1,86±0,012 | 1,93±0,005 |
| 96 ore               | -                                       | -              | 1,74±0,009                  | 1,93±0,006 | 2,07±0,008 |

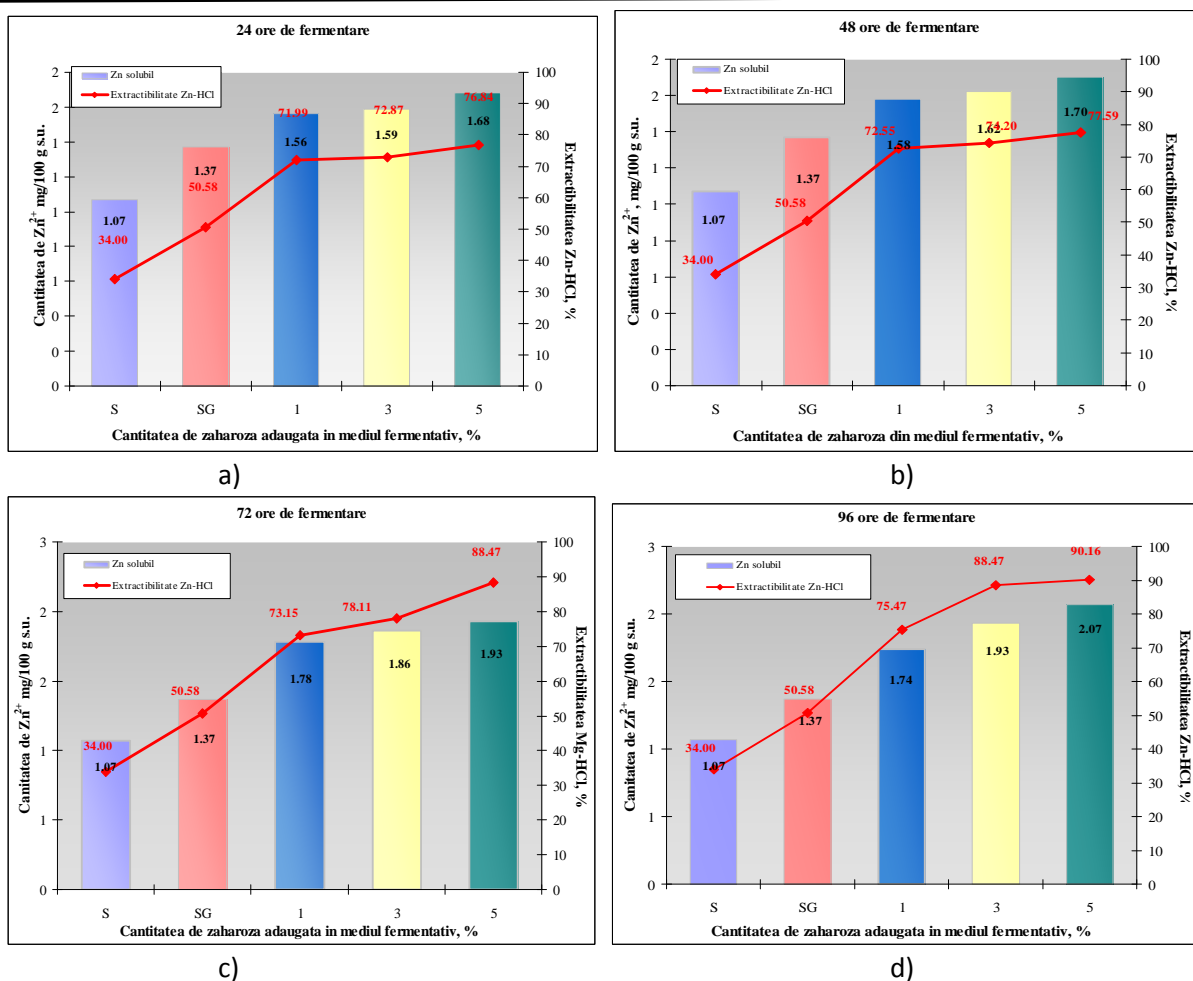
\* Valorile reprezintă media a trei determinări ± devierea standard

Boabele mature de soia conțin 1,07 mg Zn solubil / 100 g s.u. (tabelul 4.20) și 2,185mg/100 g s.u. zinc total (tabelul 3.18), ceea ce reprezintă o extractibilitate de 48,92% (Zn extras în HCl 0,03N) (figura 3.87).

Prin germinarea la 25°C timp de 4 zile, cantitatea de Zn solubil crește cu 28,04%, de la 1,07 mg/100 g s.u. în boabele mature la 1,37 mg/100 g s.u.

Completarea procesului de germinare a boabelor timp de 4 zile la temperaturi de 25°C cu fermentația lactică într-un mediu cu lactobacili, timp de 24, 48 72 sau 96 zile cu variația aportului suplimentar de zaharoză din mediul fermentativ determină o îmbunătățire semnificativă a gradului de biodisponibilizare a zincului, evaluat ca procent din total extras în HCl (figura 3.87).

În probele cu 3% adaos de zaharoză, în primele două zile de fermentare nivelul zincului solubil crește cu 1,88% de la 1,59 mg/100 g s.u. la 1,62 mg/100 g s.u. (figura 3.87). De asemenea, cantitatea de Zn solubil pentru probele cu 3% zaharoză fermentate timp de 72 ore este identic cu cel al boabelor de soia fermentate tot cu 3%, dar timp de 96 ore. Cea mai mare cantitate de Zn solubil a fost identificată pentru probele fermentate 96 de ore cu 5% zaharoză, dar nivelul acestui microelement este cu doar 7,25% mai mare decât cel anterior, cantitativ.



**Figura 3.87.** Evoluția nivelului de zinc solubil cu cantitatea de zaharoză adăugată și durata de fermentare: a) 24 ore; b) 48 ore; c) 72 ore; d) 96 ore

Analizând extractibilitatea în HCl a zincului se constată că aceasta crește până la un maxim de 90,16% în cazul probelor fermentate cu 5% adaos de zaharoză timp de 96 ore și că valoarea imediat următoare este cea corespunzătoare probelor F72-5 și F96-3, respectiv 88,47%. Prin urmare, continuarea fermentării cu încă 24 ore duce la o creștere a biodisponibilității zincului cu doar 1,69%.

Creșterea procentuală a extractibilității în HCl a zincului după prima zi de fermentare, comparativ cu probele germinate, a fost cu maxim 38,67% mai mare față de martor și a fost înregistrată pentru boabele de soia fermentate într-un mediu cu adaos de 5% zaharoză suplimentar.

Intensificarea acțiunii fitazei prin germinare și fermentare lactică poate constitui o explicație pentru creșterea gradului de biodisponibilizarea a mineralelor din boabele de soia astfel prelucrate. Concomitent cu creșterea nivelului mineralelor solubile se înregistrează o scădere semnificativă a cantității de fitați (Khalis, 2009, Oboh, 2003).

**Procesarea complexă, germinare și fermentare lactică determină creșterea cantității de minerale biodisponibile.** Astfel, este suficientă o fermentare timp de 72 ore cu 3% zaharoză pentru a obține o creștere a biodisponibilității calciului cu 129,74%, a Fe<sup>2+</sup> cu 87,63%, Mg<sup>2+</sup> cu 66,02% și a Zn<sup>2+</sup> cu 73,83%, față de boabele de soia crude.

### 3.5.1.9. Evoluția vitaminei B<sub>1</sub>

Vitamina B<sub>1</sub> (tiamina) are un rol central în metabolismul glucidic, insuficiența aportului afectând cu prioritate și predominant activitatea sistemului nervos central și a celui periferic. Se găsește în special în drojdia de bere, ficat, carne roșie, iar nivelul ei în legume sau leguminoase este destul de redus; în soia, cantitatea de tiamină depinde de soi, de condițiile de cultivare și variază între 0,94-1,7 mg/100g s.u. (Burzo, 1999).

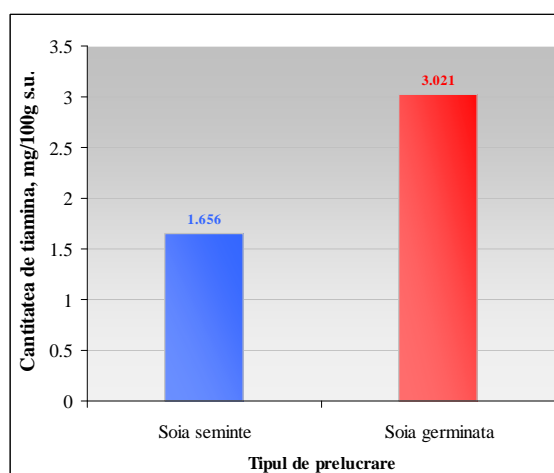
În lucrarea de față s-a studiat evoluția nivelului de tiamină din boabele de soia prelucrate prin germinare timp de 4 zile la 25°C urmată de fermentare lactică la 35°C timp de 24, 48, 72, 96 ore în prezența adaosurilor diferite de zaharoză în mediul fermentativ (1, 3 sau 5%), iar rezultatele sunt redată în tabelul 3.23, fiind interpretate și grafic.

**Tabelul 3.23.** Variația nivelului de tiamină cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

| Durata de prelucrare | Cantitatea de tiamină, mg/100 g s.u. |                |                             |             |             |
|----------------------|--------------------------------------|----------------|-----------------------------|-------------|-------------|
|                      | Soia crudă                           | Soia germinată | Soia fermentată             |             |             |
|                      |                                      |                | Concentrația de zaharoză, % |             |             |
|                      |                                      |                | 1%                          | 3%          | 5%          |
| 0                    | 1,656±0,005                          | -              | -                           | -           | -           |
| 4 zile               | -                                    | 3,021±0,006    | -                           | -           | -           |
| 24 ore               | -                                    | -              | 2,353±0,004                 | 2,606±0,005 | 2,799±0,010 |
| 48 ore               | -                                    | -              | 2,434±0,011                 | 2,448±0,008 | 2,516±0,003 |
| 72 ore               | -                                    | -              | 2,124±0,007                 | 1,943±0,012 | 1,742±0,008 |
| 96 ore               | -                                    | -              | 1,597±0,004                 | 1,333±0,004 | 1,091±0,009 |

\* Valorile reprezintă media a două determinări ± devierea standard

Germinarea la 25°C pentru 4 zile reprezintă un proces biotehnologic prin care nivelul de tiamină din boabele de soia crește de la 1,656 mg/100g s.u. în cele neprelucrate la 3,021 mg/100g s.u. din cele germinate, ceea ce reprezintă o creștere cu 82,43% (figura 3.93). (Bahaciu, 2008).



**Figura 3.93.** Evoluția nivelului de tiamină în timpul germinării

Creșterea semnificativă a cantității de tiamină prin germinare se poate explica prin necesitatea de sinteză a cofactorilor enzimatici, tiaminpirofosfat (TPP), implicat în ciclul lui Krebs și în catena de respirație cu fosforilarea oxidativă (Segal, 2006).

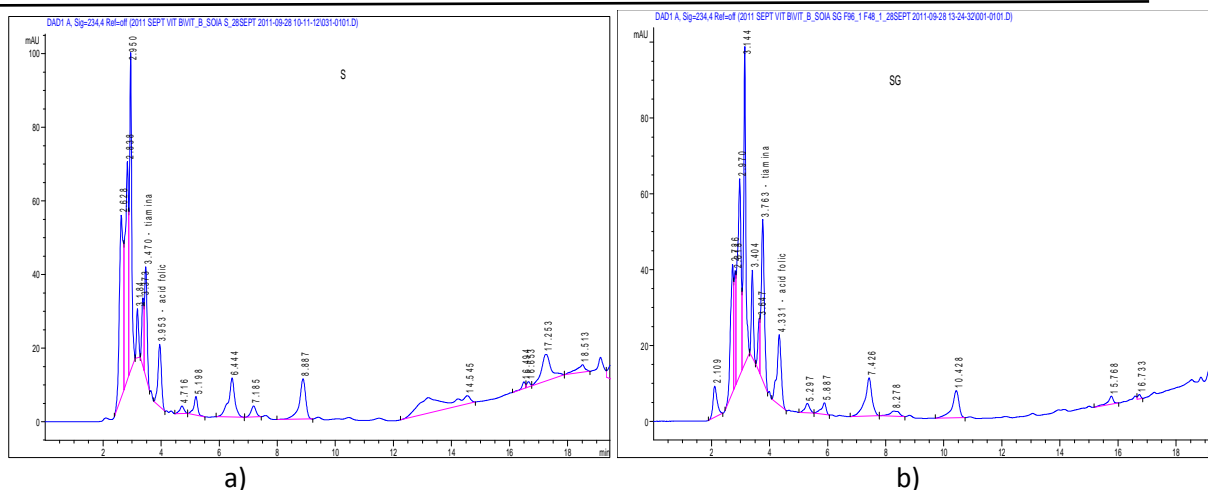


Figura 3.94. Cromatograme obținute pentru analiza boabelor de soia: a) crudă, b) germinată

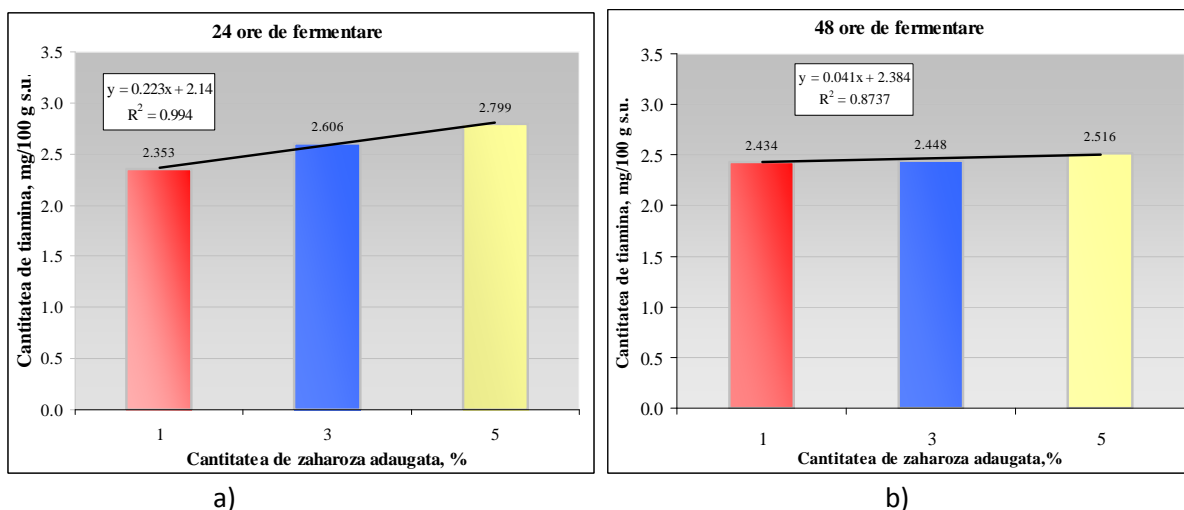
Fermentarea lactică a boabelor de soia germinate determină modificarea cantității de tiamină în mod diferit, funcție de durata de fermentare și de nivelul de zaharoză din mediul fermentativ (figura 3.96).

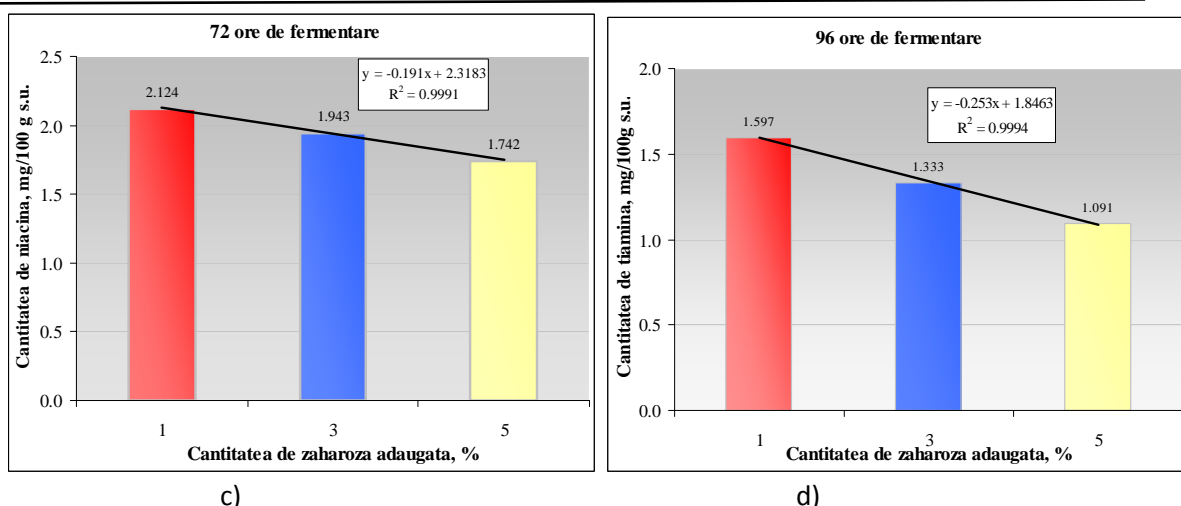
Astfel, în primele 24 ore de fermentare nivelul tiaminei crește funcție de cantitatea de zaharoză adăugată, cu 10,75% și 18,96% în probele cu 3, respectiv 5% zaharoză suplimentară, comparativ cu cele în care aportul de zaharoză din mediu a fost de numai 1% (figura 3.96 a).

Aceeași evoluție se înregistrează și pentru următoarele 24 ore de fermentare, numai că nivelul de creștere este de doar 0,571% respectiv 3,37% pentru probele cu 3, respectiv 5% zaharoză față de cele cu 1% zaharoză în mediul fermentativ (figura 3.96 b).

În ultimele două zile de fermentare (după 72-96 ore), cantitatea de tiamină scade pentru toate variantele de adaos de zaharoză în mediul fermentativ ajungând la 1,742 mg/100g s.u., respectiv 1,091 mg/100g s.u. (figura 3.96 c și d).

Se poate observa astfel că după 72 ore de fermentare lactică, cantitatea de tiamină din boabele de soia prelucrate biotehnologic rămâne superioară celei din boabele crude de soia (1,656 mg/100g s.u.), dar ultima variantă de fermentare, după 96 ore conduce la niveluri ale tiaminei cu 34,12% mai mici decât cele din boabele neprelucrate.





**Figura 3.96.** Evoluția nivelului de tiamină cu cantitatea de zaharoză adăugată și durata de fermentare: a) 24 ore; b) 48 ore; c) 72 ore; d) 96 ore

Scăderea nivelului de tiamină prin fermentarea lactică a boabelor timp de 72, respectiv 96 ore se poate explica prin aceea că lactobacilii din mediul fermentativ necesită pentru creștere vitamine din grupul B (Dan, 1999), așa că probabil utilizează din resursele de vitamină B<sub>1</sub> bobului de soia prelucrat prin germinare.

Aceste date se corelează și cu cele referitoare la dinamica dezvoltării bacteriilor lactice; maximum de dezvoltare și înmulțire a lactobacililor s-a înregistrat după 72 ore de fermentare lactică, proces ce necesită niveluri ridicate de tiamină, motiv pentru care cantitativ, aceasta scade în boabele prelucrate prin fermentare.

Este interesant de subliniat că introducerea boabelor de soia germinate în mediul fermentativ cu bacterii lactice determină o scădere a nivelului tiaminei încă din primele 24 ore de fermentare (figura 3.96). Astfel, scăderea cantitativă a tiaminei în boabele fermentate, comparativ cu cele germinate este cu 7,35%, 13,74% și 22,11% pentru probele cu 5, 3 sau respectiv 1% zaharoză adăugată în mediul fermentativ.

Aceași evoluție descendentă se înregistrează pentru toate duratele de fermentare, ajungându-se la scăderi maxime cu până la 63,89% după fermentarea timp de 96 ore cu un adaos de 5% zaharoză în mediul fermentativ (figura 3.100 d).

#### Concluzii parțiale:

- ☞ Germinarea este un proces eficient de creștere a nivelului de tiamină din boabele de soia, nivelul acesteia crescând în boabele germinate cu 82,43%;
- ☞ Continuarea procesării prin fermentare lactică în medii cu 1, 3 sau 5% zaharoză adăugată suplimentar determină scăderea cantității de tiamină comparativ cu cel din boabele germinate; acesta se menține însă superior celor din boabele neprelucrate, cu excepția probelor fermentate 96 ore. Deși fermentația lactică determină per global o reducere a nivelului de tiamină comparativ cu cel din boabele de soia germinate, probabil datorită consumului ei de către bacteriile lactice, acest procedeu este recomandat a fi utilizat cu scopul ameliorării calităților senzoriale ale boabelor de soia;
- ☞ Cea mai eficientă combinație a procedurilor biotehnologice de prelucrare cu scopul de a îmbogăți conținutul de tiamină din boabele de soia este reprezentată de germinarea timp de 4 zile la 25°C urmată de fermentarea cu 5% zaharoză timp de 48 ore; în această situație nivelul tiaminei atinge valori de 2,516 mg/100g s.u., cu 51,93% mai mari decât cele din boabele mature de soia neprelucrate;
- ☞ Boabele de soia prelucrate biotehnologic prin germinare și fermentație lactică pot fi utilizate cu succes în salate, sau preparate crude pe bază de legume, într-o alimentație sănătoasă cu un aport important de vitamină B<sub>1</sub>.

### 3.5.1.10. Evoluția activității antioxidante a boabelor de soia

Din tabelul 3.24 reiese că boabele de soia ca atare, negerminate și nefermentate prezintă o putere reductoare de 0,186 mg Fe<sup>2+</sup> / g s.u., care crește de 2,89 ori, ajungând la valori de 0,537 mg Fe<sup>2+</sup> / g s.u., doar prin germinarea timp de 4 zile la 25°C.

**Tabelul 3.24.** Variația activității antioxidante cu durata de fermentare și cantitatea de zaharoză adăugată\*

| Durata de prelucrare | Activitatea antioxidantă, mg Fe <sup>2+</sup> / g s.u. |                |                             |             |             |
|----------------------|--|----------------|-----------------------------|-------------|-------------|
|                      | Soia crudă   | Soia germinată | Soia fermentată             |             |             |
|                      |  |                | Concentrația de zaharoză, % |             |             |
|                      |  |                | 1%                          | 3%          | 5%          |
| 0                    | 0,186±0,006  | -              | -                           | -           | -           |
| 4 zile               | -  | 0,537±0,024    | -                           | -           | -           |
| 24 ore               | -  | -              | 0,773±0,009                 | 0,809±0,011 | 0,821±0,009 |
| 48 ore               | -  | -              | 0,858±0,006                 | 0,878±0,006 | 0,901±0,011 |
| 72 ore               | -  | -              | 0,877±0,006                 | 0,912±0,011 | 0,929±0,022 |
| 96 ore               | -  | -              | 0,851±0,010                 | 0,864±0,006 | 0,897±0,003 |

\* Valorile reprezintă media a trei determinări ± devierea standard

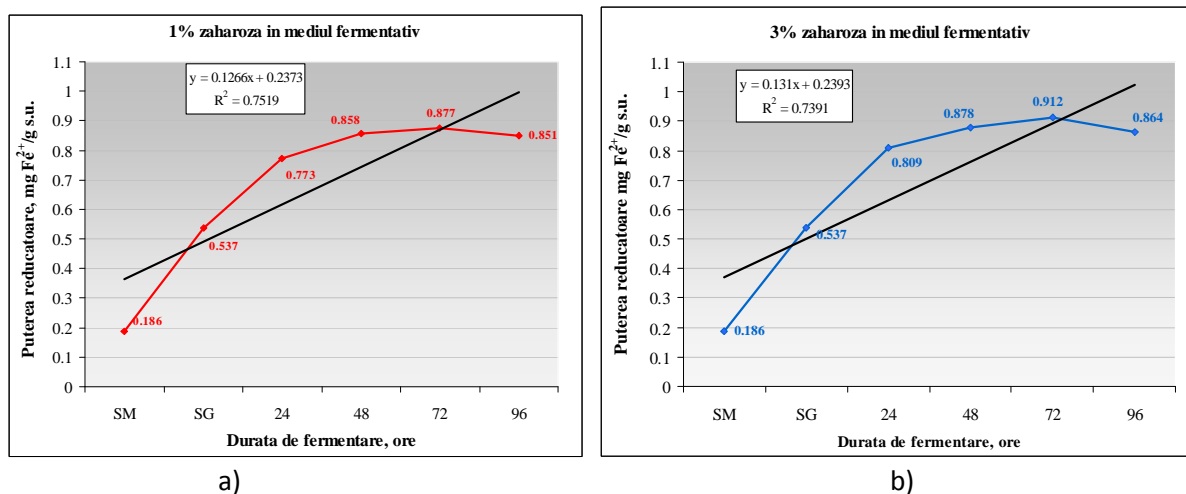
Posibilul mecanism pentru îmbunătățirea activității antioxidante a boabelor de soia poate fi corelată cu modificările cantității izoflavonelor și al glicozidelor lor prin germinare. Astfel, activitatea β-glicozidazei crește prin germinare și implicit determină hidroliza izoflavonelor cu eliberarea agliconilor (daidzeina și genisteina). Aceste forme sunt agenți antioxidanți mai puternici și determină protejarea celulelor la oxidare sau întreruperea lanțului de peroxidare (Lee, 2005). În plus, creșterea nivelului total al fenolilor din soia prin germinare determină creșterea proprietăților antioxidante ale boabelor germinate (Lin, 2006).

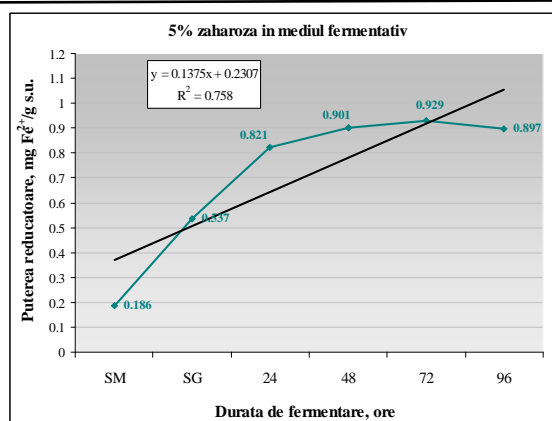
Completarea germinării cu fermentația lactică determină o creștere a puterii reductoare cu durata de fermentare și cu cantitatea de zaharoză cu care este suplimentat mediul fermentativ (figura 3.103).

Din figura 3.103 a se poate observa că fermentarea boabelor de soia într-un mediu cu 1% zaharoză, determină creșterea liniară a puterii reductoare de la 0,773 mg Fe<sup>2+</sup>/g s.u. în primele 24 ore de fermentare până la 0,877 mg Fe<sup>2+</sup>/g s.u. după 72 ore de fermentare.

Ultimele 24 de ore de fermentare sunt caracterizate de o ușoară scădere a puterii reductoare a boabelor de soia fermentate în prezența a 1% zaharoză până la 0,851 mg Fe<sup>2+</sup>/g s.u. (-2,96% comparativ cu cele fermentate 72 ore).

Aceași evoluție a fost observată pentru probele fermentate cu 3 și 5% zaharoză în mediul de fermentare (figura 3.103 b și c). Nivelul maxim al puterii reductoare atinge în aceste cazuri valori de 0,912 mg Fe<sup>2+</sup>/g s.u. pentru probele cu 3% zaharoză și 0,929 mg Fe<sup>2+</sup>/g s.u. pentru cele cu 5% zaharoză.





c)

**Figura 3.103.** Puterea reducătoare a boabelor de soia germinate și fermentate cu adaos de zaharoză: a) 1% ; b) 3%; c) 5%

Prin analiza semnificațiilor și a coeficienților de corelație,  $R^2$  a puterii reducătoare a boabelor de soia cu durata și particularitățile mediului fermentativ, se poate observa că modelul este bine definit la un nivel de semnificație de 5% ( $p < 0,5$ ).

Cea mai mare îmbunătățire a activității antioxidante a boabelor de soia se înregistrează pentru varianta de adaos a 5% zaharoză în mediul fermentativ, însă diferențele între concentrații nu sunt mai mari de 4,3%.

După 24 de ore de fermentare, valoarea puterii reducătoare a boabelor de soia germinate și fermentate într-un mediu cu 1% zaharoză a fost cu 43,95% mai mare decât cel al boabelor germinate și a atins valori de 0,821 mg Fe<sup>2+</sup>/g s.u. pentru cele fermentate cu 5% zaharoză.

Aceeași tendință crescătoare s-a înregistrat și pentru activitatea antioxidantă a boabelor de soia fermentate la toate duratele experimentale. Nivelul maxim al puterii reducătoare a fost 0,901 mg Fe<sup>2+</sup>/g s.u. după 48 ore, 0,929 mg Fe<sup>2+</sup>/g s.u. în a treia zi de fermentație și a ajuns la 0,897 mg Fe<sup>2+</sup>/g s.u. la sfârșitul experimentelor, după 96 ore.

Scăderea puterii reducătoare a boabelor de soia fermentate mai mult de 72 ore se poate explica prin încetinirea activității lactobacililor cu reducerea consecutivă a nivelului fenolilor, precum și cu scăderea cantității de aminoacizi din soia ca urmare a consumului lor de către bacteriile lactice, ca sursă preferențială de azot (Chaiyavat, 2001).

Valoarea puterii reducătoare atinge maximum după 72 ore de fermentare și este cu 69,83% mai mare decât cea a matorului germinat.

**În urma determinărilor experimentale, s-a demonstrat că varianta de fermentare cu 3% zaharoză nu diferă mult față de maxim, putând fi de asemenea folosită ca metodă de îmbunătățire a caracteristicilor nutriționale ale boabelor de soia (Bahaciu, 2011b).**

#### Concluzii parțiale:

☞ Prelucrarea biotehnologică complexă a boabelor de soia reprezintă o cale de amplificare a potențialului lor antioxidant.

☞ O bună combinație de parametri ce se poate utiliza pentru a obține un maxim al intensității puterii reducătoare a boabelor de soia fermentate după germinare este fermentare lactică timp de 72 ore cu adaos de 5% zaharoză suplimentar în mediul fermentativ.

☞ Prin urmare, procesările biotehnologice studiate pot conduce la obținerea unor produse cu un nivel ridicat al acțiunii antioxidante care vin în întâmpinarea nevoii consumatorilor către o alimentația sănătoasă, cu rol benefic asupra sănătății.

#### 4.5.2. Evaluarea senzorială a boabelor de soia procesate biotehnologic

Îmbunătățirea parametrilor senzoriali ai boabelor de soia doar prin germinare nu este evidentă, acestea păstrându-și din păcate mirosul și gustul caracteristic de leguminos. Din aceste considerente, ne-am propus să vedem dacă o intervenție biotehnologică suplimentară (fermentarea) rezolvă aceste aspecte ale calității soiei. Rezultatele au confirmat așteptările.

Analiza senzorială este o determinare foarte importantă deoarece arată gradul de acceptabilitate a produselor de soia investigate (boabe de soia martor – germinate 4 zile / 25°C, fermentate cu adaos de 1, 3 sau 5% zaharoză, timp de 24, 48, 72 și 96 ore) de către consumatori.

Astfel, utilizând această metoda de evaluare am putut observa efectele procesărilor aplicate asupra aspectului, gustului, mirosului și texturii boabelor de soia.

Referitor la **aspectul** boabelor de soia se constată din analiza figurii 3.110 că proba martor (soia germinată) a fost punctată de evaluatori cu un scor mediu de 6,165 (îmi place moderat). Aspectul boabelor de soia martor a fost descris de degustători ca fiind galben-gri, cu ușoare tente verzui, plăcut în general.

Din figura 3.110 se poate vedea că cel mai mare scor al aspectului (7,561 – îmi place mult) a fost obținut de boabele de soia fermentate 72 ore cu adaos de 3% zaharoză, boabele având un aspect plăcut, ferme, cu o culoare galben pai, strălucitoare, foarte apreciate de degustători.

Prin urmare, nu există diferențe foarte mari în ceea ce privește aspectul în cazul boabelor de soia fermentate timp de 24, 48 și 72 de ore, indiferent de adaosul de zaharoză, toate scorurile fiind peste 7. Singura excepție o fac boabele de soia fermentate 96 ore, când punctajele scad sub 6 (cel mai mare fiind de 5,796 – îmi place puțin spre moderat). Explicația ar fi aceea că prin prelungirea germinării cu încă 24 ore, respectiv până la 4 zile culoarea boabelor capătă tente gri și nu mai este strălucitoare, nemaifiind la fel de apreciată de consumatori (figura 3.110).

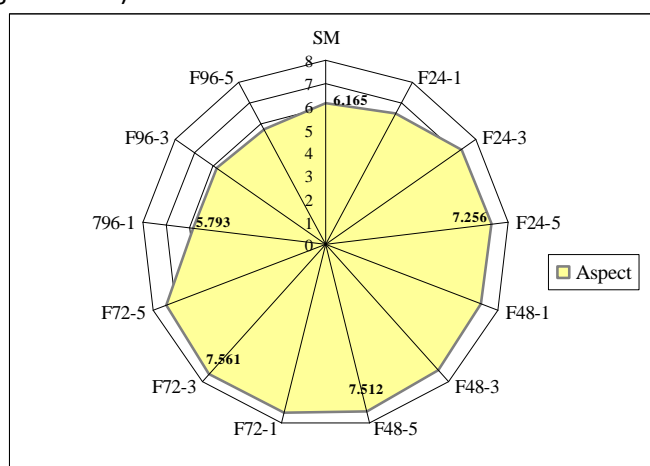


Figura 3.110. Curba de profil senzorial pentru aspectul boabelor de soia prelucrate biotehnologic

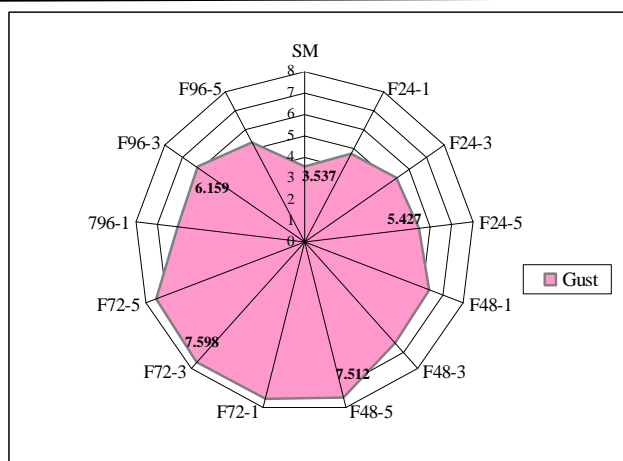
**Gustul** boabelor de soia germinate sau germinate și fermentate cu 1, 3 sau 5% adaos de zaharoză în mediul fermentativ, timp de 24, 48, 72 și 96 ore a fost a doua caracteristică senzorială investigată în acest studiu de echipa de degustători.

Datele de punctaj ale gustului sunt cumulate în tabelul 3.26.

Gustul probei martor nu a fost agreat de degustători, care l-au apreciat ca neplăcut, ușor amărui și specific de leguminos, punctajul fiind de 3,537 (îmi displace moderat spre puțin). Pe măsură ce probele au fermentat, gustul acestora s-a ameliorat, s-a dezvoltat și aprecierile au fost pozitive: gust plăcut, dulce-acrișor, fără senzație de amăreală.

Pentru o imagine de ansamblu a efectului pe care l-au exercitat procesările biotehnologice de germinare (timp de 4 zile la 25°C) și fermentație lactică asupra gustului boabelor de soia, am reprezentat în figura 3.112 curba de profil senzorial pentru gustul boabelor de soia simultan funcție de durata de fermentare și de cantitatea de zaharoză adăugată suplimentar în mediul fermentativ.





**Figura 3.112.** Curba de profil senzorial pentru gustul boabelor de soia prelucrate biotehnologic

Astfel, probele analizate a înregistrat valori diferite ale scorurilor pentru gust, pornind de la un minim de 3,537 pentru proba martor (germinată), până la un maxim de 7,598 (pentru soia fermentată 72 ore cu adaos de 3% zaharoză).

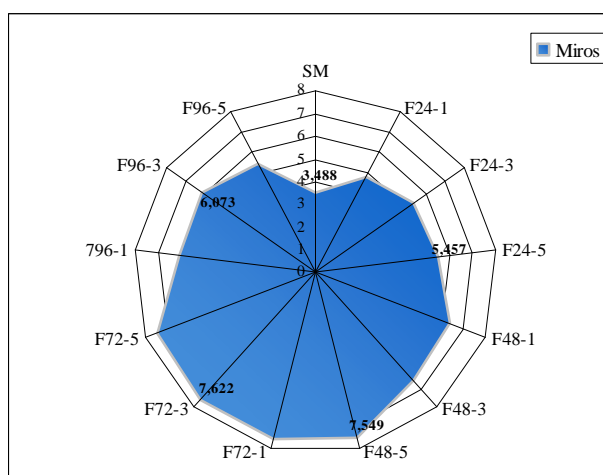
Se poate observa că cele mai apreciate din punct de vedere al gustului, au fost probele fermentate timp de 48, respectiv 72 ore când aprecierile au depășit scorul 7 (îmi place mult).

Probele fermentate 96 ore au fost apreciate mai bine decât cele fermentate 24 ore, dar mai slab decât celelalte două variante. Gustul lor a fost apreciat ca fiind prea acru și a fost punctat cu un maxim de 6,159 (îmi place moderat).

Evaluarea **mirosului** probelor de soia analizate arată că germinarea urmată de fermentare îmbunătățește net această caracteristică senzorială, iar valorile de punctaj sunt redată în figura 3.114.

De aici se poate observa că mirosul probelor fermentate 96 ore a fost ușor depreciat prin creșterea senzației de acru, dar punctajul a fost totuși bun, încadrându-se ușor peste „îmi place moderat” (6,073).

Evoluția mirosului la fermentare este în corelație cu cea a gustului și aromei, cele mai apreciate probe, cu punctaj mai mare decât 7 au fost F48-5 și F72-3, cu scoruri de 7,549 și 7,622 respectiv (ambele cu semnificația „îmi place mult”).



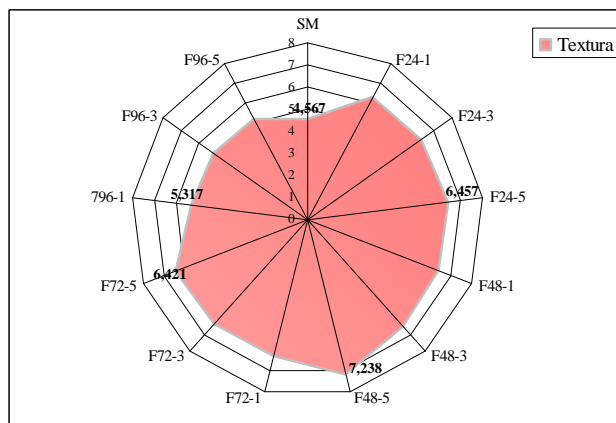
**Figura 3.114.** Curba de profil senzorial pentru mirosul boabelor de soia prelucrate biotehnologic

Un parametru cu o evoluție interesantă a fost **textura** boabelor de soia prelucrate biotehnologic.

Aceasta a fost foarte apreciată chiar și în probele supuse doar germinării și s-a deteriorat pe parcursul prelucrării prin fermentare lactică, atunci când valorile de punctaj obținute au fost scăzute.

Acest indicator a înregistrat scorurile cele mai ridicate obținute de boabele de soia martor-germinate, 4,567 (îmi place puțin), textura boabelor fiind descrisă de degustători ca fibroasă, masticabilă, ușor casantă (figura 3.116). Astfel se poate constata că fermentarea timp de 24 ore cu adaos de 5% zaharoză a avut

efectul cel mai bun asupra texturii pentru durata aceasta de fermentare; scorul obținut a fost de 6,457 (îmi place moderat spre mult).



**Figura 3.116.** Curba de profil senzorial pentru textura boabelor de soia prelucrate biotehnologic

Textura cea mai apreciată a fost cea corespunzătoare boabelor de soia fermentate timp de 48 ore cu adaos de 5% zaharoză; punctajul obținut a fost de 7,238 (îmi place mult).

Pe măsura creșterii duratei de fermentare, textura se deteriorează, se înmoaie, boabele nu mai sunt așa crocante și ferme, devin ușor lipicioase și gumoase. Astfel, prin fermentarea timp de 96 de ore cu adaos de 1% zaharoză s-a acordat pentru textură un punctaj de 5,317, îmi place moderat (Bahaciu, 2009 a și b).

#### Concluzii parțiale:

☞ Germinarea boabelor de soia ca metodă singulară de prelucrare nu este suficientă pentru îmbunătățirea calităților senzoriale ale acestora, singurele caracteristici apreciate fiind textura și aspectul.

☞ Prin prelucrarea prin fermentare a semințelor de soia germinate se obține o îmbunătățire evidentă a calităților senzoriale, așa cum reiese din analiza senzorială.

☞ Aspectul boabelor de soia germinate și fermentate este foarte apreciat, total schimbat în bine, comparativ cu cel al boabelor germinate (figura 3.117).



**Figura 3.117.** Aspectul boabelor de soia germinate și fermentate lactic

☞ Cele mai apreciate probe din punct de vedere al mirosului, gustului și aspectului au fost F72-3 și F48-5 (germinate și fermentate 72 ore cu 3% adaos de zaharoză, respectiv 48 ore cu 5% zaharoză).

☞ Textura cea mai bună, conform scorurilor acordate de echipa de degustători a fost înregistrată pentru probele F48-5 (germinate și fermentate 48 ore cu 5% zaharoză), urmate de F72-3 și F24-5 (fermentate 72 ore cu 3% zaharoză și 24 ore cu 5% zaharoză respectiv).

☞ Prin caracteristicile lor senzoriale, boabele de soia germinate și fermentate lactic sunt componente plăcute într-o salată de crudități, iar prin natura și calitatea compușilor ce-i conțin, produse valoroase în alimentație.

## CONCLUZII FINALE

1. Analizând sub aspectul gradului de solubilizare a compușilor macromoleculari și a **extractului solubil**, se recomandă procesarea boabelor de soia prin germinare la 25°C timp de 4 zile urmată de fermentarea lactică timp de 72 ore cu 5% zaharoză.

2. Pentru atingerea unui nivel al **acidității** care să asigure o conservare temporară, corelat cu calități senzoriale optime ale boabelor de soia prelucrate biotehnologic, se recomandă prelucrarea lor prin germinare urmată de fermentarea lactică timp de 48 ore cu 5% sau 72 ore cu un adaos de 3% zaharoză.

3. Evoluția și dezvoltarea **bacteriilor lactice** în mediul fermentativ reprezentat de extractul de tărâțe de grâu, suplimentat cu zaharoză, în care s-au imersat boabe de soia germinate s-au înscris în liniile specifice stadiilor de dezvoltare a bacteriilor:

4. Imersarea boabelor de soia germinate într-un mediu de fermentare lactică (extract din tărâțe de grâu), suplimentat cu 3 sau 5% zaharoză asigură premisele dezvoltării optime a lactobacililor (prin asigurarea factorilor nutritivi, glucide simple, fermentescibile și azot neproteic și aminic, ca sursă preferențială de azot).

5. Germinarea boabelor de soia timp de 4 zile la 25°C determină o scădere a nivelului tuturor **glucidelor solubile**: zaharoza scade cu 95,81%, fructoza cu 91,71%, iar glucoza cu 80,16% comparativ cu cantitățile corespunzătoare din boabele negerminate.

6. Completarea germinării cu fermentația lactică determină scăderea cantitativă a tuturor glucidelor, indiferent de procentul de zaharoză adăugat suplimentar în mediul fermentativ (1, 3 sau 5%): **zaharoza** ajunge la valori subunitare; **fructoza** scade de 1,83 ori, după 72 ore de fermentare, iar **glucoza** scade de asemenea liniar cu durata de fermentare lactică, pentru toate cantitățile de zaharoză cu care s-a suplimentat mediul fermentativ

7. Datele referitoare la evoluția nivelului **zaharozei, fructozei și glucozei** se corelează foarte bine între ele, ceea ce arată o bună interdependență a evoluției lor în timpul procesărilor biotehnologice prin germinare și fermentație lactică.

8. **Oligoglucidele de flatulență** dispar din boabele de soia după prelucrarea lor prin germinare la 25°C timp de 4 zile urmată de fermentația lactică timp de 24 ore cu 1% zaharoză în mediul fermentativ.

9. Germinarea și fermentația lactică asigură îmbunătățirea valorii nutritive a semințelor de soia prin creșterea cantitativă a **azotului neproteic**, solubil, mai ușor de asimilat de organism și a creșterii în acest fel a gradului de digestibilitate a proteinelor din boabele de soia. Cea mai intensă hidroliză a proteinelor are loc prin germinarea boabelor de soia la 25°C timp de 4 zile urmată de fermentație lactică timp de 48 ore cu 3 sau 5% zaharoză.

10. **Azotul aminic** crește spectaculos prin germinare, ajungând ca în boabele germinate 4 zile la 25°C să fie de 3,55 ori mai mare decât în cele neprelucrate. O prelucrare a boabelor de soia prin germinare timp de 4 zile urmată de fermentarea într-un mediu cu 3% zaharoză timp de 48 sau maxim 72 ore poate conduce la creșteri semnificative ale cantității de azot aminic, cu efecte benefice asupra gradului de digestibilitate a proteinelor.

11. Germinarea boabelor de soia timp de 4 zile la 25°C determină o bună reducere a **activității ureazei** (35,79%), care este însă mai mică decât reducerea de 85% obținută prin tratamente termice de procesare.

12. Combinarea germinării cu fermentarea lactică pentru a obține o reducere mai bună a activității ureazice a fost eficientă; rezultatele au arătat că procesarea biotehnologică dublă a determinat scăderea activității ureazice față de boabele neprelucrate cu până la 86,26% (după 72 și 96 ore de fermentare), valori similare celor obținute prin procesările termice. Avantajul utilizării acestor două metode combinate pentru reducerea activității inhibitorului tripsinic este acela că sunt protectoare față de ceilalți compuși bioactivi ai boabelor de soia (vitamine, factori antioxidanți, minerale solubile).

13. Prelucrarea boabelor de soia prin germinare timp de 4 zile urmată de fermentație lactică timp de 48 ore cu adaos de 3 sau 5% zaharoză se recomandă pentru a se înregistra creșteri importante ale nivelului fosforului anorganic (maximum 57,84% comparativ cu probele crude, neprocesate). Combinarea acestor procedee biotehnologice determină creșterea cantitativă a fosforului anorganic și scăderea estimată indirect a nivelului fitaților din boabele de soia, cu efecte benefice asupra calității nutriționale ale acestei leguminoase.

**14.** Procesarea complexă, germinare și fermentare lactică determină creșterea cantității de **minerale biodisponibile**. Astfel, este suficientă o fermentare timp de 72 ore cu 3% zaharoză pentru a obține o creștere a biodisponibilității calciului cu 129,74%, a  $\text{Fe}^{2+}$  cu 87,63% ,  $\text{Mg}^{2+}$  cu 66,02% și a  $\text{Zn}^{2+}$  cu 73,83%, față de boabele de soia crude.

**15.** Germinarea este un proces eficient de creștere a nivelului de tiamină din boabele de soia, nivelul acesteia crescând în boabele germinate cu 82,43%, iar cel mai eficient procedeu biotehnologic de prelucrare este germinarea timp de 4 zile la 25°C urmată de fermentarea cu 5% zaharoză timp de 48 ore, când nivelul tiaminei atinge valori cu 51,93% mai mari decât cele din boabele mature de soia neprelucrate.

**16.** Cea mai bună combinație de parametri ce se poate utiliza pentru a obține un maxim al intensității puterii reducătoare a boabelor de soia fermentate după germinare este fermentare lactică timp de 72 ore cu adaos de 5% zaharoză suplimentar în mediul fermentativ.

**17.** Germinarea boabelor de soia ca metodă singulară de prelucrare nu este suficientă pentru îmbunătățirea calităților senzoriale ale acestora, singurele caracteristici apreciate fiind textura și aspectul. Prin prelucrarea suplimentară prin fermentare se obține o îmbunătățire evidentă a calităților senzoriale, așa cum reiese din analiza senzorială. Cele mai apreciate probe din punct de vedere al mirosului, gustului și aspectului au fost cele germinate și fermentate 72 ore cu 3% adaos de zaharoză, respectiv 48 ore cu 5% zaharoză, iar cea mai bună textură a fost înregistrată pentru probele germinate și fermentate 48 ore cu 5% zaharoză, urmate de fermentate 72 ore cu 3% zaharoză.

**18.** Boabele de soia prelucrate biotehnologic prin germinare și fermentație lactică pot fi utilizate cu succes în salate, sau preparate crude pe bază de legume, într-o alimentație sănătoasă cu un aport important de vitamina B<sub>1</sub>, comparabil ca nivel cu cea din germeii de grâu sau a cărnii roșii slabe.

**Prin urmare, procesarea biotehnologică a boabelor de soia prin germinare urmată de fermentare lactică într-un mediu cu adaos de zahăr fermentescibil reprezintă soluții tehnologice interesante pentru îmbunătățirea valorii alimentare a acestei leguminoase:**

☞ **Se îmbunătățește valoarea nutritivă prin creșterea nivelului extractului solubil, a gradului de solubilizare a proteinelor (exprimat ca o creștere a azotului neproteic și aminic), a gradului de biodisponibilizare a mineralelor, a reducerii factorilor antinutritivi (inhibitorul tripsinic și factorii de flatulență), precum și creșterea nivelului vitaminelor solubile și a activității antioxidante;**

☞ **Are loc o îmbunătățire a calității senzoriale prin reducerea gustului și mirosului de leguminos și a altor caracteristici importante;**

☞ **Inocuitatea boabelor de soia crește prin prelucrarea biotehnologică de fermentare lactică prin asigurarea unui mediu acid datorită formării acidului lactic, precum și datorită prezenței lactobacililor care conduc la inhibarea dezvoltării microbiotei de alterare și patogene.**

**BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ**

1. Abu-Salem F.M., Abou-Arab E A. 2011. Physico-chemical properties of tempeh produced from chickpea seeds, *Journal of American Science*, 7 (7)
2. Adewumi G.A., Odunfa SA, 2009. Effect of lactic fermentation on antinutritional factors in Nigerian local beans (*Vigna unguiculata*) varieties, *Nigeria Food Journal*, vol. 27, nr. 2, (www.ajol.info/journals/nifoj) ISSN 0189-7241
3. Adewumi GA, Odunfa SA, 2009a. Effect of controlled fermentation on the oligosaccharides content of two common Nigerian *Vigna unguiculata* beans (*drum* and *oloyin*), *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (11), p. 2626-2630, ISSN 1684–5315
4. Anyakora C, Afolami I, Ehianeta1 T, Onwumere F., 2008. HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 2(2). p. 029-036, April, 2008
5. Apata DF. 2008. Effect of cooking methods on available and unavailable carbohydrates of some tropical grain legumes, *African Journal of Biotechnology* Vol. 7, 16, p. 2940-2945, ISSN 1684–5315.
6. Aslam J., Mohajir MS., Khan S.A., Khan A.Q., 2008. HPLC analysis of water-soluble vitamins (B1, B2, B3, B5, B6) in *in vitro* and *ex vitro* germinated chickpea (*Cicer arietinum* L.) *African Journal of Biotechnology*, vol. 7(14), p. 2310-2314, ISSN 1684–5315.
7. **Bahaciu, Gratiela Victoria**, Segal Rodica, 2011a. Effect of germination and lactic fermentation on the trypsin inhibitor content of soybean (*Glycine max.*), *Romanian Biotechnological Letters*, In Press
8. **Bahaciu, Gratiela Victoria**, Segal Rodica, 2011b. Improvement of the antioxidant activity of soybean (*Glycine max.*) by biotechnological processing, *Romanian Biotechnological Letters*, In Press
9. **Bahaciu Gratiela Victoria**, Nistor L., Ianitchi D., 2009a. Soybean seeds fermentation: the evolution of sensorial characteristics with time, temperature and composition of fermentative medium, Volumul simpozionului "Protecția mediului și siguranță alimentară – priorități și perspective", Târgoviște.
10. **Bahaciu Gratiela Victoria**, Nistor L., Ianitchi D., 2009b. Soybean seeds germination: the evolution of sensorial characteristics with time and temperature, Volumul simpozionului "Protecția mediului și siguranță alimentară – priorități și perspective", Târgoviște.
11. **Bahaciu Gratiela Victoria**, 2008. Evolution of thiamin, riboflavin, niacin and ascorbic acid content during germination of soybean seeds (*Glycine max.*) *Proceedings of the International Symposium of New Researches in Biotechnology*, Serie F, p. 241, ISSN 1224-7774.
12. **Bahaciu Gratiela**, Mamină L., Hodoșan C., 2004. Efectul duratei de înmuiere și a tratamentului termic asupra conținutului de oligozaharide din boabele de soia, volumul Sesiunii Anuale de Comunicări Științifice „Zootehnia Românească în Perspectiva Integrării în Uniunea Europeană”, Iași.
13. **Bahaciu Gratiela**, 2003. Procesarea soiei prin germinare – efectul asupra biodisponibilității in vitro a fierului În vol. celei de-a 33-a Sesiuni Internaționale de Comunicări Științifice a Facultății de Zootehnie, București
14. **Bahaciu Gratiela**, Segal R., Lungu C., 2001. Evoluția conținutului de acid ascorbic în soia în funcție de durata de germinare, volumul simpozionului „Alimentele și sănătatea la începutul mileniului III”- Galați, Ed. Academica, p. 45, ISBN 973-8316-15-4
15. **Bahaciu Gratiela**, Segal R., Lungu C., 2001. Evoluția conținutului în minerale al soiei în funcție de durata de germinare, volumul simpozionului „Alimentele și sănătatea la începutul mileniului III”- Galați, Ed. Academica, p. 42, ISBN 973-8316-15-4
16. **Bahaciu Gratiela**, Lungu C, Pancu M, 2000. Efectul germinării și al fermentației lactice asupra extractibilității în HCl a mineralelor din mei, *Analele Universității „Aurel Vlaicu” din Arad*, Fascicula Inginerie Alimentară, Arad, p. 99-102, ISN1582-3415
17. Bejarano, P.I.A., et.al. 2008. Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietinum* L.) nutritional and physicochemical properties. *Food Chem.* (1): 106-112.
18. Bellaloui N., Bruns H.A., Gillen A.M., Abbas H.K., Zablotowicz RM., Mengistu A, Paris RL. 2010. Soybean seed protein, oil, fatty acids, and mineral composition as influenced by soybean-corn rotation, *Agricultural Sciences*, vol.1, No.3, 102-109 . 2010
19. Bilyeu KD., Zeng P, Coello P et. al., 2008. Quantitative Conversion of Phytate to Inorganic Phosphorus in Soybean Seeds Expressing a Bacterial Phytase, *Plant Physiology*, February 2008, vol. 146, pp. 468–477
20. Brownson D.M., Azios NG., Fuqua BK., Dharmawardhane Su F., Mabry TJ., 2011. Flavonoid Effects Relevant to Cancer, *J Nutr.*, 5, p.3482S-3484S.
21. Chaiyavat C, Thapana K, Pramote T, Wandee R., 2010. Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation, *African Journal of Biotechnology*, vol. 9(26), p. 4120-4126, 28  
Chen C. C., Shih Y. C., P. Chiou W. S., Yu B. 2010. Evaluating Nutritional Quality of Single Stage- and Two Stage-fermented Soybean Meal, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 23, No. 5 : 598 – 606

22. Chimezie Anyakora, Ibukun Afolami, Teddy Ehianeta and Francis Onwumere, 2008. HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria, African Journal of Pharmacy and Pharmacology, vol. 2(2). p. 029-036.
23. Coelho CM M, Bellato CM, Marcelino AC, et .al., 2008. Variation in Phytate Accumulation in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Fruit Explants, Brazilian Archives of Biology and Technology, vol.51, n. 1 : pp.163-173
24. da Silva Agostini J, Balduino Nogueira R., Iouko Ida E., 2010. Lowering of Phytic Acid Content by Enhancement of Phytase And Acid Phosphatase Activities during Sunflower Germination vol.53, n. 4: pp. 975-980
25. Dan. V., 1999. Microbiologia produselor alimentare, vol. 1, Editura Alma, Galați
26. Daur Ihsanullah, Khan IA and Jahangir M. 2008. Nutritional quality of roasted and pressure-cooked chickpea compared to raw (*Cicer arietinum* L.) seeds. Sarhad J. Agric. Vol. 24, No.1, 111-115.
27. Eltayeb, M.M., Hassa, AB., Mohamed, GA, Babiker, EE, 2008. Effect of processing followed by fermentation on HCl extractability of Ca, P, Fe, Zn of Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) Cultivars, International Journal of Agricultural Research, 3 (5): 349-356, ISSN 1818-4897
28. Feng S., Lee Saw C., Lee YK, Huang D., 2008. Novel Process of Fermenting Black Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] Yogurt with Dramatically Reduced Flatulence-Causing Oligosaccharides but Enriched Soy Phytoalexins. J. Agric. Food Chem.56, 10078–10084
29. Frias J., Song YS, Martínez-Villaluenga C. et al., 2008. Immunoreactivity and Amino Acid Content of Fermented Soybean Products, J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 99–105
30. Gernah, DI., Ariahu, CC, Ingbian EK. 2011. Effects of malting and lactic fermentation on some chemical and functional proprieties of maize (*Zea mais*). American Journal of Food Technology, vol. 6, nr. 5, 404-412
31. Granito M., Guinand J., Pérez S., Pérez D. Morros M., 2008. Contenido de carbohidratos en variedades autóctonas de *Phaseolus vulgaris* cultivadas en Venezuela, Rev. Fac. Agron. (LUZ). 25: 649-664
32. Granito M., Valero Y., Pérez S. 2009. Vida útil de granos *Phaseolus vulgaris* L. fermentados y listos para el consumo Rev. Fac. Agron. (LUZ).26: 88-106
33. Haiwei R. 2010. Antioxidant and free radical-scavenging activities of black soybean peptides (BSP), Int J Agric & Biol Eng. vol. 3, No.2, 64-69.
34. Hongwei Si, Dongmin Liu, 2008. Soy phytoestrogen genistein up-regulates the expression of human endothelial nitric oxide synthase and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats, J. Nutr., 138(2), p.297–304.
35. Jianfen Liang, Bei-Zhong Han, M.J. Robert Nout and Robert J. Hamer, 2008. Effects of soaking, germination and fermentation on phytic acid, total and *in vitro* soluble zinc in brown rice, Food Chemistry, Vol. 110, 4, pag. 821-828
36. Khalid S. Al-Numair, Saif EBA, Abdullah H. Al-A, Mohammed S.A, 2009. Hydrochloric acid extractable minerals and phytate and polyphenols contents of sprouted faba and white bean cultivars, Food Chemistry 113, 997–1002
37. Kim JA., Jung, WS, Chem SC et al. 2008. A correlation between the level of the poliphenolic components and the antioxidant capacity in cooked-with-rice and vegetable soybean (*Glycine max*) varieties, European Food Research and Technology, 224, 259-270.
38. Kim, HJ., et.al. 2010. Antioxidant activity of glyceollins derived from soybean elicited with *Aspergillus sojae*, J. Agric. Food Chem., 58, 11633-11638.
39. Krička T, Jurišić V., Voća N., Ćurić D., Brlek Savić T., Matin A. 2009. Amino Acid Composition, Urease Activity and Trypsin Inhibitor Activity after Toasting of Soybean in Thick and Thin Layer, Agriculturae Conspectus Scientificus, vol. 74, 3 209-213
40. Kumar V., Sinha AK., Makkar Harinder P.S., Becker K. 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review, Food Chemistry, 120, p. 945–959
41. Lateef A, et.al. 2008. Improving the quality of agro-wastes by solid-state fermentation: Enhanced antioxidant activities and nutritional qualities. World J. Microbial. Biotechnol. 24:2369-2374.
42. Lee JH, Hung YH, Chou CC 2008. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. Int. J. Food Microbiol. 121: 150-156.
43. Lee Y-L, Yang J-H, Maua J-L, 2008. Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybeans, Food Chemistry 106, 1128–1137
44. Li YY, Yu RC, Chou CC, 2010. Some Biochemical and Physical Changes during the Preparation of the Enzyme-Ripening Sufu, a Fermented Product of Soybean Curd, J. Agric. Food Chem., vol. 58, nr. 8, 4888-4893
45. Lungu C, **Bahaciu Gratiela**, Pancu M, 2000. Efectul germinării asupra extractibilității în HCl a mineralelor din mei, Analele Universității „Aurel Vlaicu” din Arad, Fascicula Inginerie Alimentară, p. 103-106, ISSN 1582-3415.
46. Lungu C., Segal R., Vizireanu C., **Bahaciu Gratiela**, 2002. The effect of germination and lactic fermentation on HCl-extractability of minerals from pearl-millet, Materialele Simpozionului Internațional “Biochimie și Biotehnologii în Industria Alimentară, Universitatea Tehnică a Moldovei, Chișinău.
47. Maskus Heather, 2010. Pulse Processing, Functionality and Application. Literature Review.

48. Mbata T. I., Ikenebomeh M. J., Ezeibe S. 2009. Evaluation of mineral content and functional properties of fermented maize (Generic and specific) flour blended with bambara groundnut (*Vigna subterranean* L), African Journal of Food Science vol. 3(4). p.107-112
49. Medeiros Coelho CM, Mattos Bellato C, Karime Marcelino A. Et. Al., 2008. Variation in Phytate Accumulation in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Fruit Explants, Brazilian Archives of Biology and Technology, vol.51, n. 1 : pp.163-173.
50. Mense S.M., Hei T.K., Ganju RK., Bhat H.K., 2008. Phytoestrogens and Breast Cancer Prevention: Possible Mechanisms of Action, Environ Health Perspect., 116, p. 426–433.
51. Messina Mark J, Wood Charles E., 2008. Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary, Nutrition Journal, 7:17-27.
52. Mora-Escobedo R., et. al., 2009. Effect of Protein Hydrolysates from Germinated Soybean on Cancerous Cells of the Human Cervix: An In Vitro Study, Plant Foods Hum Nutr (2009) 64:271–278.
53. Mugendi J. B., Njagi E. N. M., Kuria E. N., Mwasaru M. A., Mureithi J. G., Apostolides Z. 2010. Effects of processing technique on the nutritional composition and anti-nutrient content of mucuna bean (*Mucuna pruriens* L.), African Journal of Food Science Vol. 4(4), p. 156 – 166
54. Muhammad Ali, Malik Nawaz Shuja, Muhammad Zahoor, Ishtiaq Qadri, 2010. Phytic acid: How far have we come? African Journal of Biotechnology, vol. 9(11), pp. 1551-1554.
55. Nagata Yoshie, et. al. 2007. Dietary Isoflavones May Protect against Prostate Cancer in Japanese Men, J. Nutr. 137: 1974–1979.
56. Ng TB, Cheung Randy CF, Ye X., Wong Jack H, Ye X. 2011. Protease Inhibitors, Lectins, Antifungal Protein and Saponins in Soybean, In Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology, InTech Publisher,
57. Notarnicola Maria et. al., 2008. Effect of genistein on cholesterol metabolism-related genes in a colon cancer cell line, Genes Nutr., 3, p. 35–40.
58. Nout MJR, Kiers JL 2005. Tempe fermentation, innovation and functionality, Update into the third millennium. J. Appl. Microbiol. 98: 789-805.
59. Odumodu C.U., 2010. Nutrients and anti-nutrients content of dehulled soybean, Continental J. Food Science and Technology 4, p. 38 – 45, ISSN: 2141 – 422X
60. Ofuya ZM, Akhidue V. 2005. The role of pulses in human nutrition: A review. J. Appl. Sci. Environ. Manage. 9: 99-104.
61. Ojokoh AO., Yimin W, 2011. Effect of Fermentation on Chemical Composition and Nutritional Quality of Extruded and Fermented Soya Products, International Journal of Food Engineering, vol. 7, 4
62. Okoro, I A, Ojmelukwe, P C, Ekwenye, U N, 2011. Quality Characteristics of Indigenous Fermented Beverage; Pito Using *Lactobacillus sake* AS A starter culture, Continental J. Applied Sciences 6 (1):15 - 20, ISSN: 1597 – 9928.
63. Olu M, Ogunmoyela O.A.B., Oluwajoba S.O., 2011. Essential Amino Acid Composition of Sprouted and Unsprouted Maize (*Zea mays*) & Cowpea (*Vigna unguiculata*) Grains as Compared with FAO Reference Protein and Egg Protein, International Journal of Academic Research, vol. 3, no. 2, part 1.
64. Pinfield, S., Pinfield-Wells S., Graham W., 2007. Lipid metabolism in seed dormancy. In: Seed development, dormancy and germination, Blackwell Publishing, SUA.
65. Ponnusha BS, et.al. 2011. A complete evaluation of the antioxidant and antimicrobial potential of Glycine max. , Int J Cur Sci Res. 2011; 1(2): 06 – 12.
66. Pop Elena A., et.al. 2008. Effects of a high daily dose of soy isoflavones on DNA damage, apoptosis and estrogenic outcomes in healthy, postmenopausal women - a Phase I clinical trial. Menopause. 2008; 15(4 Pt 1): 684–692.
67. Rasha Mohamed K, Y. Gibriel, Nagwa M. H. Rasmy, Ferial M. Abu-Salem, Esmat A. Abou- Arab, 2011. Influence of Legume Processing Treatments Individually or in Combination on Their Trypsin Inhibitor and Total Phenolic Contents, Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(5): 1310-1322 ISSN 1991-8178
68. Rashad M. M, Mahmoud E.A, Abdou M. H, Nooman U. M. 2011. Improvement of nutritional quality and antioxidant activities of yeast fermented soybean curd residue, Afr J. of Biotech. Vol. 10(30), pp. 5750-5759
69. Rehman ZU, 2007. Domestic processing effects on available carbohydrate content and starch digestibility of black grams (*Vigna mungo*) and chickpeas (*Cicer arietium*). Food Chem. 100: 764-767
70. Rice L, et. al, 2007. Soy Isoflavones Exert Differential Effects on Androgen Responsive Genes in LNCaP Human Prostate Cancer Cells, The Journal of Nutrition, vol 137, nr. 4, p. 964-972
71. Ristowa M., Zarsea K, Oberbachc A. et al. 2009. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans, PNAS, vol. 106, 21, 8665-8670
72. Rivas-Vega, M.E., Goytortúa-Bores, E., Ezquerro-Brauer, J.M., 2006. Nutritional value of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) meals as ingredients in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone), Food Chemistry, 97, 1, 41-49.
73. Segal, R., 2006. Principiile nutriției, Editura Academica, Galați

74. Setchell KDR, Cole SJ. 2006. Method of defining equol-producer status and its frequency among vegetarians. *J Nutr.*, 136:2188–2193.
75. Szefer, P., Nriagu, J.O., 2007. Mineral components in foods, CRC Press, UK.
76. Taffouo VD, Meguekam TL, Ngueleumeni M LeP, et.al, 2010. Mineral nutrient status, some quality and morphological characteristics changes in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars under salt stress, *African Journal of Environmental Science and Technology* Vol. 4(7), pp. 471-479 ISSN 1991-637X
77. Taku Kyoko, Umegaki Keizo, Sato Yoko, Taki Yuko, Endoh Kaori, Watanabe Shaw, 2007. Soy isoflavones lower serum total and LDL cholesterol in humans: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials, *Am. J. Clin. Nutr.* , 85, p.1148 –1156.
78. Tamang, JP., Chettri R., Sharma RM, 2009. Indigenous knowlegde of NorthEast women production of ethnic fermented soybean foods, *Indian Journal of Traditional Knowledge*, vol. 8 (1), p. 122-126
79. Tamang, JP., Chettri, R., Sharma, RM., 2009. Indigenous knowledge of Northeast women on production of ethnic fermented soybean foods, *Indian Journal of Traditional Knowledge*, vol. 8 (1), p. 122-126.
80. Ukeyima, M. T., Enujiugha, V. N. Sanni, T. A., 2010. Current applications of probiotic foods in Africa, *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (4), pp. 394-401.
81. Vasconcelos, I.M., Campello, C.C., Oliveira, J.T.A., ş.a. 2006. Brazilian soybean *Glycine max* (L.) Merr. cultivars adapted to low latitude regions: seed composition and content of bioactive proteins, *Revista Brasileira de Botânica*, 29, 4
82. Velasquez, MT., Bhatena SJ. 2007. Role of Dietary Soy Protein in Obesity, *International Journal of Medical Sciences*, 4(2):72-82, ISSN 1449-1907.
83. Villegas Raquel, et.al. 2008. Legume and soy food intake and the incidence of type 2 diabetes in the Shanghai Women’s Health Study, *Am J Clin Nutr.*; 87 (1): 162–167.
84. Wang W., Mejia EGD, 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that ay prevent-related chronic diseases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 4, 63-80.
85. Wang, N., Hatcher, D. W., and Gawalko, E. J. 2008. Effect of variety and processing on nutrients and certain anti-nutrients in field peas (*Pisum sativum*). *Food Chemistry*, 111, 132-138
86. Watanabe, N.; Aoki, H. & Fujimoto, K. 2008. Fermentation of soybean by *Rhizopus* promotes the calcium absorption ratio in rats. *J. Sci. Food Agri.*, 88, 2749-2752.
87. Watanabe, N.; Endo, Y.; Fujimoto, K. & Aoki, H. 2006. Tempe-like fermented soybean (GABA-tempe) has an effective influence on lipid metabolism in rats. *J. Oleo. Sci.*, 55, 391-396.
88. Wittanalai Suttida, Rakariyatham Nuansri, Richard Deming L. 2011. Volatile compounds of vegetarian soybean kapi, a fermented Thai food condiment, *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(5), pp. 821-830, ISSN 1684–5315
89. Wongputtisai P, Khanongnuch C, Pongpiachan P, Lumyong S. 2007. Antioxidant activity improvement of soybean meal by microbial fermentation. *Res. J. Microbiol.* 2: 577-583.
90. Wu TY, Kan MS, Siow LF, Palniandy LK, 2010. Effect of temperature on moromi fermentation of soy sauce with intermittent aeration, *African Journal of Biotechnology*, vol. 9(5), p. 702-706
91. Wu, AH, Koh, W-P, Wang, R., Lee, H-P, Yu, MC., 2008. Soy intake and breast cancer risk in Singapore Chinese Health Study, *British Journal of Cancer*, 99, 196 – 200
92. Xu C., Hao K, Peng C, Cai W, Jin Z. 2005. Effects of Fermentation Temperature and Time on the Physicochemical and Sensory Characteristics of Douchi, *Food Technol. Biotechnol.* 43 (3) 307–311
93. Yagoub, Abu E.G et.al, 2008. Effect of soaking and cooking on chemical composition bioavailability of minerals and in vitro protein digestibility of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed, *Pakistan Journal of Nutrition*, 7, 1, 50-56
94. Yan Lin, Spitznagel EL., 2009. Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis, *Am J Clin Nutr*, 89, 1155–1163.
95. Yanfang Z, Iijuan W, Wenyi T, 2009. Biochemical changes in low-salt fermentation of solid-state soy sauce, *African Journal of Biotechnology*, vol. 8 (24), p. 7028-7034
96. Zanabria, et al. 2006. Effect of food processing of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) on the level of phenolics, phytate, iron and zinc, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, p. 1391-1398
97. Zdunczyk Z., Jankowski, J. Juskiewicz, B.A. Slominski, 2011. Dietary Content and Gastrointestinal Function of Soybean Oligosaccharides in Monogastric Animals, In *Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology*, p. 523-540
98. Zhang Z, et.al. 2008. Chemical composition and bioactivity changes in stale rice after fermentation with *Cordyceps sinensis*. *J. Biosci. Bioeng.* 106: 188-193.
99. Zhu YP, et. al. 2008. Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (*Meitauza*) using *Bacillus subtilis* B2. *Food Control*, 19: 654-661.
100. Žilić S, Hadži-Tašković Šukalović V., Srebić M. et al. 2009. Chemical compositions as quality parameters of ZP soybean and wheat genotypes, *Genetika*, vol. 41, No. 3, 297-308.