

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII
AL REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 579.22/.67/.86:637.146

CARTAȘEV ANATOLI

**TULPINI AUTOHTONE NOI DE *STREPTOCOCCUS
THERMOPHILUS* ȘI UTILIZAREA LOR PENTRU
FABRICAREA PRODUSELOR LACTATE FERMENTATE**

167.01. BIOTEHNOLOGIE, BIONANOTEHNOLOGIE

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific:

RUDIC Valeriu,
doctor habilitat în științe biologice,
profesor universitar,
academician, Om emerit al Republicii
Moldova, specialitatea 167.01.
Biotehnologie, bionanotehnologie

Autor:

CARTAȘEV Anatoli

CHIȘINĂU, 2018

© Cartășev Anatoli, 2018

CUPRINS

ADNOTĂRI	5
LISTA ABREVIERILOR	8
INTRODUCERE	9
1. BACTERIILE LACTICE DIN SPECIA <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i> ȘI UTILIZAREA LOR ÎN INDUSTRIA LAPTELUI	17
1.1. Caracterizarea bacteriilor lactice din specia <i>Streptococcus thermophilus</i>	17
1.2. Culturile starter, clasificarea și aspectele tehnologice de utilizare a lor la fabricarea produselor lactate fermentate.....	28
1.3. Tehnologia de fabricare a produselor lactate fermentate.....	37
1.4. Concluzii la capitolul 1	41
2. OBIECTELE DE STUDIU ȘI METODELE APLICATE ÎN CERCETARE	43
2.1. Obiectele de studiu.....	43
2.2. Mediile nutritive utilizate în studiu.....	47
2.3. Metode de cercetare.....	48
2.4. Concluzii la capitolul 2.....	67
3. SELECTAREA TULPINILOR AUTOHTONE NOI DE <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i>	68
3.1. Izolarea culturilor pure de bacterii lactice din specia <i>Streptococcus thermophilus</i>	69
3.2. Caracteristicile culturale și morfologice ale tulpinilor autohtone noi de <i>Streptococcus thermophilus</i>	74
3.3. Caracteristicile fiziologice și biochimice ale tulpinilor autohtone noi de <i>Streptococcus thermophilus</i>	77
3.4. Identificarea tulpinilor izolate de <i>Streptococcus thermophilus</i> prin aplicarea tehnicilor biologiei moleculare.....	83
3.5. Proprietățile tehnologice ale tulpinilor autohtone noi de <i>Streptococcus thermophilus</i>	90
3.6. Sinteza exopolizaharidelor (EPS) de către <i>Streptococcus thermophilus</i> în condiții de cultivare periodică.....	90
3.7. Concluzii la capitolul 3.....	98
4. APLICAREA TULPINILOR SELECTATE DE <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i> ÎN COMPOZIȚIA CULTURILOR STARTER	99
4.1. Optimizarea mediului de protecție pentru liofilizarea biomasei tulpinilor de <i>Streptococcus thermophilus</i>	99
4.2. Elaborarea asociațiilor simbiotice de bacterii lactice autohtone pentru iaurt	106
4.3. Includerea culturilor starter elaborate în procesul tehnologic de fabricare a iaurtului.....	114
4.4. Determinarea termenului de valabilitate a iaurtului.....	123
4.5. Fezabilitatea economică a utilizării culturilor starter autohtone în procesul tehnologic de preparare a produselor lactate fermentate.....	124
4.6. Concluzii la capitolul 4	128
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	130
BIBLIOGRAFIE	132
ANEXE	146

Anexa 1. Certificat de efectuare a stagiului de doctorat la Food Research Institute, Slovacia.....	147
Anexa 2. Adeverințe de depozitare a tulpinilor autohtone noi de <i>Streptococcus thermophilus</i>	148
Anexa 3. Proces verbal de fabricare a loturilor experimentale de bacterii lactice (5 tulpini) din specia <i>Streptococcus thermophilus</i>	153
Anexa 4. Cerere de brevet de invenție s2017 0090 „Procedeu de obținere a concentratului bacterian uscat pentru fabricarea produselor lactate fermentate”...	154
Anexa 5. Instrucțiunea Tehnologică IT MD 67-0041795-079:2016 pentru fabricarea culturilor bacteriene concentrate liofilizate pentru produse lactate fermentate conform SM 308:212.....	156
Anexa 6. Adeverință de depozitare și pașaportul al tulpinii <i>Lactobacillus bulgaricus</i> CNMN-LB-42.....	157
Anexa 7. Act de implementare a tehnologiei de fabricare a produsului de brânză semitare cu grăsimi vegetale eliberat de SA SUCCES (Râșcani, R. Moldova) la 27.04. 2006.....	158
Anexa 8. Proces verbal de producere a culturilor starter, eliberat de DTA a IP IȘPHTA la 20.06.2015.....	159
Anexa 9. Act de implementare a culturilor starter în cadrul concernului SA JLC-Group (Chișinău, R. Moldova) din 15.06.2015.....	160
Anexa 10. Extras din Proces verbal de degustare a sortimentului de iaurt cu conținut de culturi starter din tulpini autohtone de <i>S. thermophilus</i>	161
Anexa 11. Brevet de invenție de scurtă durată MD 865 „Procedeu de obținere a produsului lactate fermentat.....	165
Anexa 12. Diplome la Saloanele internaționale de invenții.....	166
Anexa 13. Darea de seamă referitor la determinarea termenului de valabilitate pentru sortimentul de iaurt fabricat cu culturi starter autohtone pe bază de tulpini din specia <i>S. thermophilus</i>	169
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....	170
CV-ul AUTORULUI.....	171

ADNONTARE

CARTĂȘEV Anatoli „Tulpini autohtone noi de *Streptococcus thermophilus* și utilizarea lor pentru fabricarea produselor lactate fermentate”, teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2018.

Teza conține 4 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie cu 169 titluri, 13 anexe, 131 pagini de text de bază, 44 de figuri, 29 tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 21 de lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: *Streptococcus thermophilus*, tulpini autohtone, culturi starter, exopolizaharide, iaurt.

Domeniul de studiu: 167.01. Biotehnologie, bionanotehnologie.

Scopul lucrării constă izolarea, identificarea și evaluarea caracteristicilor fiziologo-biochimice și biotehnologice ale unor tulpini noi de *S. thermophilus*, selectate în vederea elaborării culturilor starter autohtone și utilizării lor la fabricarea produselor lactate fermentate.

Obiectivele lucrării: izolarea în cultură pură a bacteriilor lactice tipice speciei *S. thermophilus* din lapte și produsele lactate de fermentare spontană din diferite zone ale R. Moldova; identificarea fenotipică și genotipică a tulpinilor izolate și evidențierea tulpinilor cu potențial biotehnologic înalt pentru industria laptelui; stabilirea parametrilor optimi de cultivare și păstrare a tulpinilor producătoare de exopolizaharide din specia *S. thermophilus* în condiții industriale; elaborarea și testarea în condiții de producere a culturilor starter autohtone în baza asociațiilor mixte de tulpini noi de bacterii lactice pentru fabricarea lactatelor fermentate.

Noutatea și originalitatea științifică. Au fost propuse pentru industria produselor lactate tulpini noi de bacterii lactice termofile cu potențial biotehnologic înalt, izolate din lapte și produsele lactate de fermentare spontană din diferite zone ale R. Moldova. În baza tulpinilor selectate au fost elaborate culturi starter autohtone noi pentru prepararea iaurtului ce se caracterizează prin activitate înaltă de fermentare a laptelui.

Problema științifică soluționată. Au fost selectate și descrise tulpini noi de bacterii lactice din specia *S. thermophilus*, ceea ce a condus la elaborarea culturilor starter autohtone cu potențial biotehnologic înalt pentru industria de procesare a laptelui, fapt ce a permis eficientizarea procesului de fabricare a produselor lactate fermentate.

Semnificația teoretică constă în acumularea de date noi referitor la biodiversitatea tulpinilor autohtone de *S. thermophilus* din lapte și produsele lactate de fermentare spontană din diferite zone ale R. Moldova; argumentarea științifică a perspectivei utilizării culturilor starter autohtone de bacterii lactice termofile pentru prepararea iaurtului. Aplicarea tehnicilor de biologie moleculară pentru identificarea tulpinilor studiate de *S. thermophilus* au demonstrat relevanța tehnicilor Rep-PCR și FT-IR pentru identificarea speciilor de bacterii lactice din surse naturale.

Valoarea aplicativă a lucrării constă în elaborarea culturilor starter autohtone pentru fabricarea lactatelor fermentate în baza asociațiilor mixte de tulpini noi de bacterii lactice, depozitate în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene, precum și elaborarea documentului tehnico-normativ „Instrucțiunea Tehnologică IT MD 67-0041795-079:2016 Culturi bacteriene concentrate liofilizate pentru produsele lactate fermentate. Condiții tehnice”.

Implementarea rezultatelor științifice: rezultatele cercetărilor efectuate au fost implementate în cadrul concernului de industrializare a laptelui „JLC Group” la fabricarea loturilor experimentale de iaurt și la SA „Succes” la fabricarea produsului de brânză semitare.

АННОТАЦИЯ

Карташев Анатолий „Новые местные штаммы *Streptococcus thermophilus* и их использование для получения ферментированных молочных продуктов”, диссертация кандидата биологических наук, Кишинев, 2018.

Диссертация включает 4 главы, заключения и рекомендации, библиографический список из 169 названий, 13 приложений, 131 страниц основного текста, содержит 44 рисунка, 29 таблиц. Результаты исследований опубликованы в 21 научных работах.

Ключевые слова: *Streptococcus thermophilus*, местные штаммы, стартерные культуры, экзополисахариды, йогурт.

Специальность: 167.01. биотехнология, бионанотехнология.

Цель работы состоит в изоляции, идентификации и оценке физиолого-биохимических и биотехнологических характеристик новых штаммов *S. thermophilus*, отобранных для подготовки местных стартерных культур и их использования в производстве ферментированных молочных продуктов.

Задачи работы: получение чистых культур молочнокислых бактерий, типичных для вида *S. thermophilus*, из молока и спонтанно ферментированных молочных продуктов из разных частей Республики Молдова; фенотипическая и генотипическая идентификация изолированных штаммов и выделение штаммов с высоким биотехнологическим потенциалом; установление оптимальных параметров культивирования и консервации штаммов *S. thermophilus*, продуцирующих экзополисахариды в промышленных условиях; разработка и тестирование в условиях производства местных стартерных культур на основе смешанных ассоциаций новых штаммов молочнокислых бактерий для производства ферментированных молочных продуктов.

Научная новизна и оригинальность. Были предложены для использования в молочной промышленности новые штаммы термофильных молочнокислых бактерий с высоким биотехнологическим потенциалом, выделенные из молока и молочных продуктов спонтанной ферментации. На основе выбранных штаммов были приготовлены новые местные стартерные культуры для приготовления йогурта, характеризующиеся высокой ферментативной активностью.

Решенная научная проблема. Отобраны и описаны новые штаммы молочнокислых бактерий *S. thermophilus* с целью создания местных стартерных культур с высоким биотехнологическим потенциалом для молочной промышленности, что позволило повысить эффективность процесса производства ферментированных молочных продуктов.

Теоретическое значение заключается в накоплении новых данных о биологическом разнообразии местных штаммов *S. thermophilus* из молока и молочных продуктах спонтанной ферментации; научная аргументация возможности использования местных стартерных культур термофильных молочнокислых бактерий для приготовления йогурта. Была доказана актуальность методов Rep-PCR и FT-IR для идентификации видов молочных бактерий из природных источников.

Практическое значение работы состоит в разработке стартерных культур для производства ферментированных молочных продуктов и Технологической инструкции IT MD 67-0041795-079:2016 „Концентрированные лиофилизированные бактериальные культуры для ферментированных молочных продуктов. Технические условия”.

Внедрение научных результатов: Полученные результаты были внедрены в рамках концерна молочной промышленности „JLC Group” для производства экспериментальных серий йогурта и на АО „Succes” для производства полутвердого сырного продукта.

ABSTRACT

Cartasev Anatoli: "Novel indigenous strains of *Streptococcus thermophilus* and their use in the dairy products manufacturing", PhD thesis in biological sciences, Chisinau, 2018.

The thesis consists of an introduction, 4 chapters, general conclusions and recommendations, bibliography list with 169 references. It comprises 131 pages of the main text, 44 figures, 29 tables and 13 annexes. The results were published in 21 scientific papers.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*, indigenous strains, starter culture, exopolysaccharides, yogurt.

Field of study: 167.01. Biotechnology, Bionanotechnology.

Research Goal consists in isolation, identification and evaluation of physiological, biochemical and biotechnological characteristics of new *S. thermophilus* strains selected for the purpose of preparing indigenous starter cultures and their use in the production of fermented dairy products.

The objectives of the study: isolation of pure cultures of typical for *S. thermophilus* lactic acid bacteria from milk and spontaneously fermented dairy products from various regions of the Republic of Moldova; phenotypic and genotypic identification of isolated strains and characterization of biotechnologically valuable strains for the dairy industry; selection of optimal parameters for the cultivation and preservation of exopolysaccharide - producing strains of *S. thermophilus* under industrial conditions; development of indigenous starter cultures based on mixed associations of new strains of lactic acid bacteria and their application for the production of cultured dairy food.

Scientific novelty and originality. New strains of thermophilic lactic acid bacteria with high biotechnological potential, isolated from milk and spontaneous fermentation dairy products from various regions of the Republic of Moldova have been proposed for the dairy industry. On the basis of the selected strains, new native starter cultures with high milk fermentation activity were developed for the preparation of yogurt.

The main scientific problem solved in the study. New *S. thermophilus* strains have been selected and described for the purpose of developing indigenous starter cultures with high biotechnological potential for the milk processing industry to streamline the production of fermented dairy products.

Theoretical value consist in accumulation of new data on the biodiversity of indigenous strains of *S. thermophilus* isolated from milk and spontaneous fermentation dairy products from different regions of the Republic of Moldova; the scientific argumentation of the use of autochthonous starter cultures based on thermophilic lactic acid bacteria for the preparation of yoghurt. The molecular techniques Rep-PCR and FT-IR for identification and typing of new *S. thermophilus* strains have emerged as reliable method for the identification of lactic acid bacteria species from natural sources.

Applicative value consists in elaboration of the starter cultures for the fermented dairy products preparation, described by the technical-normative document Technology Instruction MD 67-0041795-079: 2016 "Lyophilized concentrated bacterial cultures for fermented dairy products. Technical conditions".

Implementation of scientific results. The results of the studies have been implemented within "JLC Group" milk industrialization concern for the production of an experimental industrial yoghurt batch and SA "Succes" for the production of demi soft cheese.

LISTA ABREVIERILOR

ADN - Acidul dezoxiribonucleic

ANOVA – Analiza de varianță;

ARNm - Acid ribonucleic mesager;

ATCC – American Type Culture Collection

cSt – centiStokes;

EPS – Exopolizaharide;

FTIR - Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy;

HipperLader 50bp – Marker molecular de masă pentru determinarea rapidă a mărimii fragmentelor ADN (50-2000bp);

LacS – Lactose transporter of *Streptococcus thermophilus*;

NAD/NADH - Nicotinamide adenine dinucleotide;

NMMAFA – Numărul de microorganisme mezofile aerobe și facultativ anaerobe;

pb – perechi de bază

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reacția de polimerizare în lanț);

Rep-PCR – Repetitive element palindromic PCR;

SUD – Substanțe uscate degresate;

UFC – Unități formatoare de colonii;

Ø – Diametru, (mm);

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța cercetărilor. Procesele tehnologice bazate pe activitatea microorganismelor au semnificație deosebită pentru biotehnologia modernă, strâns legată de evidențierea și selectarea microorganismelor noi cu proprietăți specifice, ceea ce presupune o creștere a diversității produselor biotehnologice.

Varietatea largă de produse lactate fermentate se datorează utilizării culturilor starter, care conțin diferite specii de bacterii lactice special selectate. Streptococii termofili și lactococii mezofili sunt cele mai utilizate culturi bacteriene pentru fabricarea produselor lactate fermentate la scară industrială. Capacitatea bacteriilor lactice termofile de a crește și se multiplica la temperaturi de 37-45 °C este o condiție importantă fiind asociată cu procesul tehnologic de fabricare a produselor lactate fermentate, cum ar fi iaurtul, laptele covăsit și diverse brânzeturi [142].

În ultimii ani a crescut interesul cercetătorilor față de bacteriile lactice termofile, lucru în mare măsură legat de dezvoltarea industriei produselor lactate din lume, precum și de valorificarea tulpinilor noi de bacterii lactice în calitate de tulpini starter. În Republica Moldova până în prezent această tendință se reliefează slab, exprimându-se printr-un nivel insuficient de utilizare a culturilor starter autohtone.

Pentru ameliorarea proprietăților reologice ale produselor lactate fermentate și extinderea duratei lor de păstrare sunt utilizate diferite sisteme stabilizatoare, deseori modificate chimic [14, 101]. În acest sens, în ultimii ani, o mare atenție se acordă tulpinilor care sintetizează exopolizaharide (EPS) cu potențial de utilizare în calitate de sursă naturală de aditivi alimentari, ceea ce ameliorează parametrii reologici ai produselor lactate și contribuie la aderarea microorganismelor probiotice la pereții intestinali. Interesul deosebit față de bacteriile lactice producătoare de EPS se datorează faptului că acestora li s-a atribuit un statut de securitate – GRAS (General Recognized As Safe), confirmând posibilitatea folosirii acestor microorganisme în fabricarea produselor alimentare de calitate sigură [128]. De aceea, este relevantă și avantajoasă obținerea culturilor starter pe baza tulpinilor naturale autohtone din specia *Streptococcus thermophilus* producătoare de EPS, a căror utilizare în procesul de prelucrare a laptelui va contribui la păstrarea proprietăților naturale și benefice ale produselor finite, cu caracteristici biotehnologice stabile.

Situația în domeniului de cercetare. Cercetarea tulpinilor noi de bacterii lactice de perspectivă, izolarea, identificarea și caracterizarea lor este un subiect mereu actual în biotehnologie și în special în industria laptelui.

Laptele și produsele lactate fermentate sunt substraturi favorabile pentru dezvoltarea microorganismelor de putrefacție care provoacă deteriorarea produselor. Tot din lapte și produsele lactate de fermentare spontană pot fi izolate și tulpinile de *Streptococcus thermophilus*, cea mai cunoscută caracteristică a căroră, legată de proprietatea de conservare, este capacitatea de a produce acid lactic, care, la rândul său, are acțiune antimicrobiană. Acidularea protejează laptele de microorganismele dăunătoare și de dezvoltarea agenților patogeni.

Bacteriile lactice din specia *S. thermophilus* prezintă interes atât din punct de vedere fundamental cât și aplicativ, fiind studiată posibilitatea utilizării lor în diverse procese biotehnologice. Importanța industrială a bacteriilor lactice la fabricarea diverselor produse lactate fermentate, precum și la fermentarea legumelor și a cărnii a inițiat o gamă largă de cercetări privind genetica, biochimia și biofizica acestui grup de microorganisme. Un interes deosebit în studiul bacteriilor lactice a apărut după descoperirea plasmidelor responsabile de proprietățile tehnologice importante ale culturilor [94], cum ar fi metabolismul lactozei, activitatea proteolitică, producerea bacteriocinelor, rezistența la bacteriofagi ș. a. Prin urmare, este foarte importantă aplicarea acestor metode moderne, de rând cu metodele clasice ale microbiologiei, la realizarea etapelor de izolare și identificare a bacteriilor pentru a determina apartenența lor specifică.

Tulpinile de *S. thermophilus* se utilizează atât în monocultură - la fabricarea laptelui covăsit, cât și în componența culturilor starter mixte – la fabricarea laptelui acru, iaurtului, smântânii fermentate prin tehnologie rapidă, laptelui acidofil, brânzeturilor cu pasta moale și tare [142]. Interesul crescând față de bacteriile lactice termofile, se datorează în mare măsură și dezvoltării industriei laptelui, atât pe plan mondial, cât și în Republica Moldova, prin elaborarea și fabricarea produselor lactate fermentate noi, fapt ce necesită îmbogățirea colecțiilor de microorganisme cu noi tulpini de bacterii lactice de interes biotehnologic. Conform datelor statistice, volumul de fabricare a produselor lactate fermentate în R. Moldova este în creștere: 32 659 tone în anul 2015 față de 23 934 tone în anul 2008 [1].

Astfel, mulți specialiști din industria laptelui, atât din țara noastră, cât și de peste hotare, recunosc necesitatea și importanța creării culturilor starter compuse din tulpini autohtone. Succesul fabricării produselor lactate fermentate la scara industrială este direct legat de tehnologia de prelucrare a laptelui, de selectarea, păstrarea și manipularea corectă a culturilor starter, toate acestea contribuind la obținerea unui produs finit de calitate înaltă.

Scopul cercetării expuse în prezenta lucrare constă în izolarea, identificarea și evaluarea caracteristicilor fiziologo-biochimice și biotehnologice ale unor tulpini noi de *S. thermophilus*, selectate în vederea elaborării culturilor starter autohtone și utilizării lor la fabricarea produselor lactate fermentate.

Obiectivele cercetărilor:

1. Izolarea în cultură pură a bacteriilor lactice tipice speciei *S. thermophilus* din lapte și produsele lactate de fermentare spontană din diferite zone ale R. Moldova;
2. Identificarea fenotipică și genotipică a tulpinilor izolate și evidențierea tulpinilor cu potențial biotehnologic înalt pentru industria laptelui;
3. Stabilirea parametrilor optimi de cultivare și păstrare a tulpinilor producătoare de exopolizaharide din specia *S. thermophilus* în condiții industriale;
4. Elaborarea și testarea în condiții de producere a culturilor starter autohtone în baza asociațiilor mixte de tulpini noi de bacterii lactice pentru fabricarea lactatelor fermentate.

Noutatea și originalitatea științifică. Au fost propuse pentru industria produselor lactate tulpini **noi** de bacterii lactice termofile cu potențial biotehnologic înalt, izolate din lapte și produsele lactate de fermentare spontană din diferite zone ale R. Moldova. În baza tulpinilor selectate au fost elaborate culturi starter autohtone **noi** pentru prepararea iaurtului ce se caracterizează prin activitate înaltă de fermentare a laptelui. Proprietățile tehnologice performante ale tulpinilor starter noi de *Streptococcus thermophilus* autohtone sunt confirmate prin Brevetul de invenție de scurtă durată MD-865 din 2015.01.31. și cererea de brevet de invenție de scurtă durată (S. 2017 0090 din 07.08.2017). A fost propus un mediu de protecție **nou** pentru liofilizarea culturilor de *S. thermophilus*.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare. Au fost selectate și descrise tulpini noi de bacterii lactice din specia *S. thermophilus*, ceea ce a condus la elaborarea culturilor starter autohtone cu potențial biotehnologic înalt pentru industria de procesare a laptelui, fapt ce a permis eficientizarea procesului de fabricare a produselor lactate fermentate.

Semnificația teoretică constă în acumularea de date noi referitor la biodiversitatea tulpinilor autohtone de *S. thermophilus* din lapte și produsele lactate de fermentare spontană din diferite zone ale R. Moldova; argumentarea științifică a perspectivei utilizării culturilor starter autohtone de bacterii lactice termofile pentru prepararea iaurtului.

Aplicarea tehnicilor de biologie moleculară pentru identificarea tulpinilor studiate de *S. thermophilus* au demonstrat relevanța tehnicilor Rep-PCR și FT-IR pentru identificarea speciilor de bacterii lactice din surse naturale.

Valoarea aplicativă a lucrării constă în elaborarea culturilor starter autohtone pentru fabricarea lactatelor fermentate în baza asociațiilor mixte de tulpini noi de bacterii lactice, depozitate în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene, precum și elaborarea documentului tehnico-normativ „Instrucțiunea Tehnologică IT MD 67-0041795-079:2016 Culturi bacteriene concentrate liofilizate pentru produsele lactate fermentate. Condiții tehnice”.

Tehnologia propusă a fost implementată în condiții de producere în serii la SA „JLC” (lot experimental de iaurt) și la SA „Succes” (lot experimental de produs de brânză).

Aprobarea rezultatelor. Materialele expuse în teză au fost prezentate și discutate în cadrul următoarelor manifestări științifice: Международная Конференция Молодых Ученых Биотехнологов, Молекулярных Биотехнологов и Вирусологов, Новосибирск, Россия, 2017, 2016); The III-d International Conference of Modern Technologies in the Food Industry (Chișinău, Republica Moldova, 2016); The 3rd International Conference on Microbial Biotechnology (Chișinău, Republica Moldova, 2016); Sibiu Alma Mater University Conference „Challenges for Science and Research in the Crisis Era” (Sibiu, România, 2013); Simpozionul Științific Internațional „Agricultura Modernă – Realizări și Perspective” consacrat aniversării de 80 de ani de la înființarea Universității Agrare de Stat din Moldova (Chișinău, Moldova, 2013); International Conference „Modern Technologies in the Food Industry” (Chișinău, Moldova, 2012); Conferința Tehnico-Științifică a Colaboratorilor, Doctoranzilor și Studenților (Chișinău, Moldova, 2012); International Conference of Young Researchers, 9ed. (Chișinău, Moldova, 2011), precum și la Sloanele Internaționale de Inventică: EUROINVENT (Iași, România, 2018, 2017), IV UGAL INVENT (Galați, România, 2017) și INFOINVENT (Chișinău, Republica Moldova, 2015). Rezultatele tezei au fost discutate și aprobate în cadrul ședinței extinse a laboratorului Ficobiotehnologie al IMB cu participarea cercetătorilor Colecției Naționale de Microorganisme Nepatogene și ai laboratorului Biotehnologii Alimentare al Institutului Științifico-practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare din 10 noiembrie 2017 și în cadrul Seminarului Științific de profil 167.01 Biotehnologie, bionanotehnologie din 19 ianuarie 2018.

Publicații la tema tezei. Rezultatele cercetărilor la tema tezei de doctor sunt reflectate în 21 de lucrări științifice, dintre care 9 articole (1- revistă internațională cotate ISI și SCOPUS, 3- reviste recunoscute în străinătate, 1- revistă din Registrul Național al revistelor de profil, categoria B, 4- culegeri; 3- în monoautorat), 10 rezumate ale comunicărilor științifice; 1 brevet de invenție de scurtă durată și 1 cerere de brevet de invenție de scurtă durată.

Volumul și structura tezei. Teza constă din 4 capitole; are un volum de bază de 131 pagini; conține 29 tabele, 44 figuri. 13 anexe. Lista surselor bibliografice citate include 169 titluri.

Cuvinte cheie: *Streptococcus thermophilus*, tulpini autohtone, culturi starter, exopolizaharide, iaurt.

Sumarul compartimentelor tezei

Capitolul 1 „BACTERIILE LACTICE DIN SPECIA *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* ȘI UTILIZAREA LOR ÎN INDUSTRIA LAPTELUI” include analiza realizărilor științifice în domeniul studiului și valorificării practice a bacteriilor lactice, în special a speciei *Streptococcus thermophilus*. Prima parte a capitolului este dedicată cercetărilor privind istoria taxonomică și particularitățile fiziologice și biotehnologice specifice bacteriilor din specia *S. thermophilus*. Sunt descrise cele mai importante proprietăți cum ar fi: capacitatea de acidulare a laptelui, generarea texturii, prin transformarea proteinelor din lapte, producerea metaboliților antimicrobieni și biosinteza exopolizaharidelor. Este evidențiat rolul acidului lactic și bacteriocinelor în calitate de conservanți naturali și siguri ai alimentelor. O atenție aparte este acordată biofilmului exopolizaharidic în calitate de stabilizator, care datorită capacității de legare a apei, contribuie la consolidarea structurii coagulului, asigurând o structură mai fină și o viscozitate mai mare concomitent cu prevenirea spargerii gelului și eliminării zerului.

A doua parte a capitolului 1 este consacrată culturilor starter, clasificării lor, utilizării bacteriilor lactice de *S. thermophilus* pentru fabricarea produselor lactate fermentate și include multiple informații despre rolul tulpinilor de *S. thermophilus* în procesul de fabricare a sortimentului vast de produse lactate fermentate. Capitolul se încheie cu concluzii, după care este formulată problema de cercetare, direcțiile de rezolvare a acesteia și formulate scopul și sarcinile prezentei teze.

Capitolul 2 „OBIECTELE DE STUDIU ȘI METODELE APLICATE ÎN CERCETARE” conține descrierea materialelor și metodelor utilizate pentru realizarea cercetărilor. În calitate de obiecte de studiu au servit: tulpinile autohtone de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* care au fost izolate din habitat natural – lapte și produsele lactate fermentate din diferite regiuni ale Republicii Moldova; tulpina de referință *S. thermophilus* A737 pentru cercetări genetice din Colecția Cehă de Microorganisme (Brno, Republica Cehă); tulpinile de *S. thermophilus* 1241 și *Lactobacillus casei* 4791 din colecția Departamentului de Microbiologie, Biologie moleculară și Biotehnologie al Institutului de Cercetare a Alimentelor din cadrul Centrului Național de Agricultură și Produse Alimentare din Bratislava, Slovacia; tulpinile tip de referință *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) și *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™) oferite de către laboratorul specializat al Centrului Național de Sănătate Publică al MSMPS al RM.

Pentru realizarea lucrării au fost utilizate metode clasice și moderne de izolare și identificare a bacteriilor lactice din specia *S. thermophilus*, efectuate în laboratorul Biotehnologii

alimentare din cadrul Direcției „Tehnologii Alimentare” a IP Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare (Republica Moldova). Cercetările de identificare moleculară a tulpinilor autohtone izolate: spectroscopia în infraroșu cu transformantă Fourier (FTIR), analiza secvențelor genomice repetate (Rep- PCR) au fost realizate în cadrul Departamentului de Microbiologie, Biologie Moleculară și Biotehnologie al Institutului de Cercetare a Alimentelor din cadrul Centrului Național de Agricultură și Produse Alimentare din Bratislava, Slovacia. Cercetările consacrate determinării indicilor de calitate a culturilor starter și a iaurtului au fost efectuate conform metodelor standardizate stipulate în documentația tehnico normativă (SM, GOST, ISO).

Prelucrarea statistică a datelor privind rezultatele a 3-5 repetări obținute s-a efectuat prin calcularea mediei, deviației standard și intervalului de încredere pentru o medie. Interpretarea grafică a rezultatelor a fost efectuată cu ajutorul *MO Excel* și *SigmaPlot 11.0*.

Capitolul 3 „SELECTAREA TULPINILOR NOI DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*” reflectă rezultatele cercetărilor efectuate privind: izolarea culturilor pure de bacterii lactice din specia *S. thermophilus*; descrierea însușirilor culturale și morfologice ale tulpinilor izolate; descrierea însușirilor fiziologice și biochimice ale tulpinilor de *S. thermophilus*; identificarea moleculară a bacteriilor lactice izolate; descrierea proprietăților tehnologice ale tulpinilor autohtone de *S. thermophilus*; studiul sintezei exopolizaharidelor de către tulpinile de *S. thermophilus* în condiții de cultivare periodică.

Pentru izolarea culturilor pure de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* au fost utilizate probe de lapte crud și produse lactate de fermentare spontană din diferite regiuni ale Republicii Moldova. În total au fost prelevate circa 300 probe de lapte și produse lactate de fermentare spontană din diferite regiuni ale Republicii Moldova, din care au fost obținute 7 izolate cu proprietăți caracteristice speciei *S. thermophilus*. Studiul proprietăților culturale, morfologice și fiziologo-biochimice ale culturilor a demonstrat că bacteriile selectate posedă însușiri caracteristice tulpinilor de *Streptococcus thermophilus*: nu produc catalaza, rezistă la temperatura de 60 °C timp de 30 min, nu cresc pe mediu cu 4% NaCl, dar se dezvoltă la concentrația de 2% de clorură de sodiu, nu sunt rezistente la 0,1% albastru metilen și în mediul cu pH 9,2, au viteză înaltă de acidifiere a laptelui timp de 6 ore.

Statutul taxonomic și variabilitatea intraspecifică ale celor 5 tulpini de *S. thermophilus* selectate au fost verificate prin aplicarea următoarelor tehnici: amplificarea fragmentelor ADNr 16S cu utilizarea reacției de polimerizare în lanț (PCR- Polimerase Chain Reaction) folosind primeri specifici; amplificarea secvențelor repetitive la nivelul ADN cromozomial prin tehnica Rep-PCR, spectroscopia în infraroșu cu transformantă Fourier (FTIR). Tulpinile de bacterii

lactice, selectate și identificate anterior prin metode fenotipice ca aparținând speciei *S. thermophilus*, și-au confirmă acest statut taxonomic și după efectuarea analizei secvenței genei ADNr 16S, rezultatele sugerând că tehnica dată este relevantă pentru identificarea speciilor de bacterii lactice din surse naturale. Aceiași concluzie este valabilă și pentru aplicarea Rep-PCR, confirmându-se capacitatea secvențelor genomice repetate de a diferenția tulpinile de bacterii lactice.

În rezultatul cercetărilor proprietăților tehnologice ale bacteriilor lactice selectate s-au evidențiat 2 tulpini producătoare de exopolizaharide (EPS) și s-au stabilit parametrii biotehnologici optimi pentru culturile de bacterii lactice producătoare de EPS, care și în condiții industriale produc cantități suficiente de EPS pentru îmbunătățirea calității produselor lactate, ceea ce permite excluderea substanțelor stabilizatoare din procesul tehnologic.

Capitolul 4 „APLICAREA TULPINILOR SELECTATE DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* ÎN COMPOZIȚIA CULTURILOR STARTER” este consacrat elaborării culturilor starter multiple pe baza asociațiilor tulpinilor selectate și utilizării lor la fabricarea loturilor experimentale de iaurt. În acest scop, au fost parcurse următoarele etape: optimizarea mediului de protecție pentru liofilizarea tulpinilor de *S. thermophilus*; elaborarea asociațiilor simbiotice de bacterii lactice termofile autohtone pentru fabricarea iaurtului; includerea culturilor starter elaborate în procesul tehnologic de fabricare a iaurtului; determinarea termenului de valabilitate a iaurtului fermentat cu aplicarea culturilor starter autohtone; studiul fezabilității economice a utilizării culturilor starter autohtone în procesul tehnologic de preparare a produselor lactate fermentate.

Prin aplicarea metodei matematice de planificare a experiențelor multifactoriale, a fost determinată componența optimă a mediului protector pentru liofilizarea culturilor de bacterii lactice din specia *S. thermophilus*. Raportul optim al crioprotectorilor permeabili și celor impermeabili în componența mediului dat contribuie la păstrarea viabilității și proprietăților biotehnologice ale culturilor. Culturile liofilizate în mediul protector optimizat revin la indicii productivi inițiali după 3 pasaje succesive pe mediul cu lapte degresat.

Pentru a valorifica potențialul biotehnologic al tulpinilor selectate, ele au fost incluse în asociații simbiotice de bacterii lactice prin asocierea speciilor *S. thermophilus* și *Lb. bulgaricus* în culturile starter pentru fabricarea iaurtului. Cercetările au permis selectarea a 3 culturi starter multiple cu potențial înalt de utilizare la fabricarea produselor lactate fermentate (YO1, YO2 și YO3).

În condițiile industriale ale Concernului „JLC GROUP” din mun. Chișinău, a fost fabricat un lot de iaurt, folosind culturile starter elaborate. Cercetările au stabilit că utilizarea culturilor

starter multiple contribuie la sporirea viscozității și caracteristicilor tixotrope ale iaurtului cu conținut diferit de grăsime. Studiul microstructurii iaurtului fabricat denotă, că EPS contribuie la legarea apei din produs și în special pentru produsele lactate degresate.

Rezultatele cercetărilor au contribuit la elaborarea tehnologiei de fabricare a culturilor starter pentru producerea lactatelor fermentate și a documentului tehnico-normativ Instrucțiunea Tehnologică IT MD 67-0041795-079:2016 (în corspundere cu Standardul Moldovenesc SM 306:2012 „Culturi bacteriene concentrate liofilizate pentru produse lactate fermentate. Condiții tehnice”).

Efectul economic rezultat din implementarea în circuitul economic al acestei tehnologii, ar putea fi exprimat prin costul de 6 ori mai mic al unui flacon de cultură starter autohtonă, în comparație cu costul culturilor starter provenite din import.

Compartimentul „**CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI**” reflectă analiza rezultatelor obținute formulate succint în concluziile generale și exprimă valoarea practică a lucrării prin recomandările înaintate.

Compartimentul „**BIBLIOGRAFIE**” cuprinde cele 169 surse citate în teză.

Compartimentul „**ANEXE**” conține Certificatul de stagiu doctoral la Food Research Institute, Slovacia; adeverințele de depozitare ale tulpinilor autohtone noi de *Streptococcus thermophilus*; procesele verbale de producere a culturilor bacteriene autohtone liofilizate; copia foii de titlu la „Instrucțiunea Tehnologică IT MD 67-0041795-079:2016 pentru fabricarea culturilor bacteriene concentrate liofilizate pentru produse lactate fermentate conform SM 308:212; extras din Proces verbal de degustare a sortimentului de iaurt cu conținut de culturi starter din tulpini autohtone de *S. thermophilus*; actele de implementare a culturilor starter în cadrul concernului SA JLC-Group (Chișinău, R. Moldova) din 15.09.2015 și a tehnologiei de fabricare a produsului de brânză semitare cu grăsimi vegetale eliberat de SA SUCCES (Râșcani, R. Moldova) la 27.04.2006; copiile titlului de brevet de invenție, a cererii de brevet și a diplomelor de însoțire a medaliilor, obținute la saloanele internaționale de inovații.

1. BACTERIILE LACTICE DIN SPECIA *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* ȘI UTILIZAREA LOR ÎN INDUSTRIA LAPTELUI

Studiul bacteriilor lactice, izolarea, identificarea și caracterizarea lor este un subiect mereu actual pentru biotehnologie, și în special pentru industria produselor lactate.

Produsele lactate fermentate au apărut în alimentația omului circa 8-10 mii de ani în urmă, însă cu toate acestea, până la începutul secolului XX procesul de fermentare a laptelui a avut un caracter spontan. Descoperirea și caracterizarea bacteriilor lactice a schimbat viziunile asupra procesului de fermentare a laptelui. Realizările din ultimii 60 de ani în domeniul biochimiei și fiziologiei bacteriilor lactice au permis de a selecta cele mai valoroase culturi starter pentru utilizarea lor industrială și obținerea produselor lactate de calitate și siguranță garantată, ceea ce a permis înlocuirea completă a maielelor bacteriene lichide utilizate anterior. Identificarea bacteriilor lactice poate fi efectuată prin studierea caracteristicilor fenotipice și genotipice, utilizându-se metode clasice și moderne ale sistematicii pentru stabilirea taxonilor și clasificarea lor, la fel și prin utilizarea taxonomiei polifazice, adică definirea taxonilor pe baza informațiilor obținute din diverse subdomenii, reunind astfel atât date fenotipice, cât și date de nivel molecular [43].

Identificarea bacteriilor prin metode clasice se bazează pe o serie de cercetări morfologice, structurale, fiziologice și biochimice: forma și mărimea celulei, morfologia coloniilor, produșii de fermentație, intervalul de temperatură și pH-ul optim de dezvoltare, toleranța osmotică, modul de respirație, sensibilitatea la o serie de inhibitori metabolici și mai ales la antibiotice.

Identificarea genetică este avantajoasă comparativ cu cea fenotipică clasică, dar nu o poate înlocui definitiv. Realizările identificării polifazice au demonstrat că utilizarea tuturor datelor posibile obținute prin diferite metode constituie baza taxonomiei moderne ale bacteriilor.

1.1. Caracterizarea bacteriilor lactice din specia *Streptococcus thermophilus*

Una dintre cele mai importante probleme ale industriei produselor lactate constă în selectarea de specii și tulpini bacteriene corespunzătoare cerințelor înaintate de diverse tehnologii de prelucrare a laptelui prin fermentare [154].

Bacteriile lactice reprezintă o grupă largă de microorganisme, care au proprietăți fenotipice similare exprimate prin următoarele caracteristici: bacterii Gram pozitive, imobile, nu formează spori, facultativ anaerobe, principalul produs al fermentării carbohidraților fiind acidul lactic [109].

Bacteriile lactice sunt utilizate în diverse tehnologii de fabricare a produselor lactate (brânză proaspătă, smântână și lapte fermentat), rolul lor în aceste produse fiind complex și

diversi: acidularea, care permite coagularea laptelui și reduce riscul de dezvoltare a microbiotei nedorite; formarea compușilor aromatici, care asigură calitatea organoleptică a produselor lactate și producerea agenților de îngroșare, care ameliorează proprietățile reologice ale laptelui fermentat [155].

Intrarea formală a streptococilor în istoria microbiologiei a avut loc în anul 1879, când Louis Pasteur a izolat aceste microorganisme. O descriere detaliată a genului *Streptococcus* a fost propusă în anul 1884 de patologul german Rosenbach F.J. [69]. În anul 1903 Schottmüller H. face primele încercări pentru diferențierea reprezentanților genului *Streptococcus* după aspectul coloniilor pe mediul geloză-sânge - în tulpini β -hemolitice și nehemolitice [67]. Până în anul 1933 pentru identificarea streptococilor s-a utilizat doar analiza activității fermentative. Iar în 1933 Lancefield R. a propus o metodă de depistare a grupei specifice de antigene, ce interacționează cu tulpinile β -hemolitice [84]. În anul 1937 Sherman J. a prezentat schema divizării streptococilor în patru grupuri după reacția hemolitică, antigenele de suprafață și caracteristicile fenotipice [133]. Unul dintre cele patru grupuri a inclus streptococii lactici - bacterii nepatogene pentru organismul uman, utilizate în industria laptelui. Streptococii lactici s-au manifestat ca tulpini nehemolitice, incapabile să crească la temperatura 10°C și capabile să se dezvolte la 45°C, nerezistente în mediul cu concentrația 6,5% NaCl.

Morfologia celulară a tulpinilor de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* este prezentată în Figura 1.1.

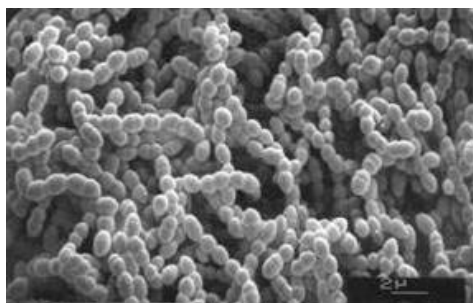


Fig. 1.1. Morfologia celulară a *S. thermophilus* în microscopia de scanare electronică [112]

Statutul taxonomic al *S. thermophilus* a fluctuat începând cu anii 80 al sec. XX datorită relației strânse dintre aceste microorganisme cu *Streptococcus salivarius* și, drept urmare, a fost clasificat ca subspecie *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. Însă *S. salivarius* nu se dezvoltă în mediul de lapte în prezența *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* și nu este adecvat pentru fabricarea iaurtului [35]. În anul 1991 Schleifer a propus revenirea la statutul separat al speciei *Streptococcus thermophilus* în baza criteriilor genetice și fenotipice [133].

*Particularitățile specifice ale bacteriilor lactice din specia *S. thermophilus*:*

Procesul de fermentare a laptelui este bazat pe activitatea bacteriilor lactice, care joacă un rol esențial în transformarea laptelui în produse lactate fermentate. Au fost determinate unele caracteristici specifice fiecărei tulpini selectate individual care se utilizează în fabricarea produselor lactate fermentate. Cele mai importante proprietăți ale bacteriilor lactice sunt capacitatea de acidulare a laptelui și generarea aromei și texturii prin transformarea proteinelor din lapte [79, 98]. Bacteriile lactice, de asemenea, produc metaboliți antimicrobieni specifici numiți bacteriocine [83]. Acidul lactic și bacteriocinele au un mare potențial de utilizare în conservarea alimentelor, fiind considerați conservanți naturali și siguri.

Metabolismul lactozei

Una dintre cele mai importante proprietăți ale speciilor de bacterii lactice constă în capacitatea de a fermenta dizaharidul prezent în lapte – lactoza cu formarea acidului lactic, în cazul speciei *S. thermophilus* pe cale de fermentare homofermentativă.

Bioconversia lactozei în acid lactic, prin acțiunea bacteriilor lactice, reprezintă procesul metabolic care inițiază șirul de transformări biochimice în fabricarea produselor lactate fermentate.

La selectarea tulpinilor pentru fermentarea produselor alimentare este important să se țină cont de proprietățile de formare a acidului lactic.

Pentru a fi fermentată, lactoza este transportată, ca atare, în celulele bacteriilor lactice prin două modalități:

- difuzie facilitată, care se realizează ca urmare a prezenței în biomembrane a unor proteine receptoare de tip permeaze, localizate la nivelul plasmalemei sau în spațiul periplasmic;
- transport activ, care este catalizat de sistemul fosfo-transferazic dependent de fosfo-enolpiruvat.

Bacteriile lactice termofile din specia *S. thermophilus* utilizează sisteme permeazice specializate pentru asimilarea lactozei, ce se deplasează intracelular cu ajutorul proteinei de transport numită LacS și care apoi este hidrolizată pentru a produce glucoză și galactoză, prin acțiunea enzimei β -galactozidaza. Glucoza este metabolizată pe calea glicolitică Embden-Meyerhof-Parnas (Figura 1.2), până la formarea acidului piruvic, apoi, fiind lipsită de enzima piruvat decarboxilază, reduce acidul piruvic, obținându-se acidul lactic sub acțiunea a două lactatdehidrogenaze care necesită NAD/NADH în calitate de coenzimă.

La insuficiență de lactoză, totuși, unele tulpini pot transforma galactoză intracelular sau extracelular pe calea metabolică Leloir.

Incapacitatea multor tulpini de *S. thermophilus* de a utiliza galactoză nu se datorează absenței genelor relevante pentru sinteza enzimelor căii Leloir, deoarece aceste gene sunt

prezente și conservate în majoritatea tulpinilor. În general, fenotipul principal se datorează expresiei slabe a acestor gene, în mod specific la nivelul transcripției ARNm și al translației.

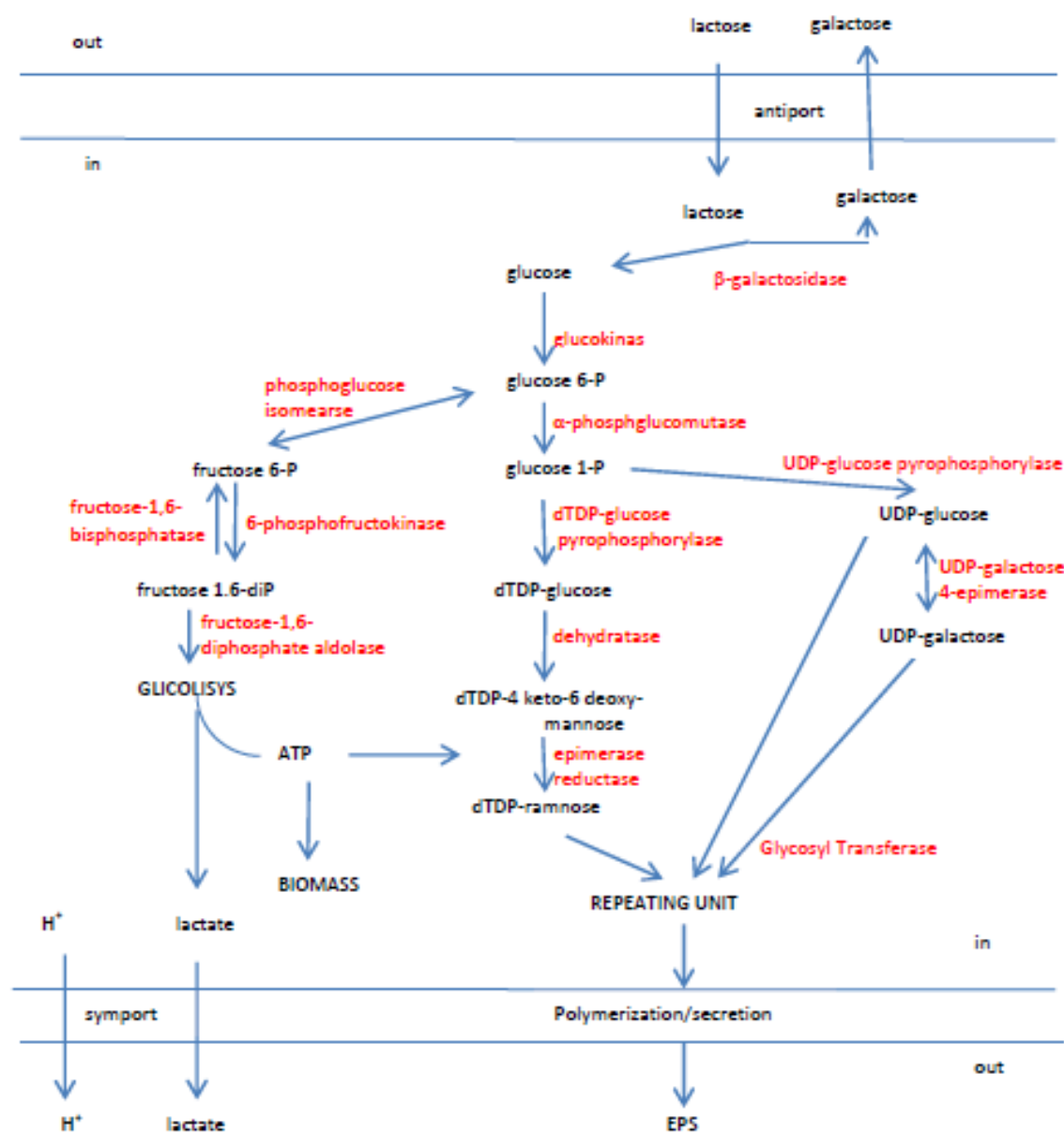


Fig. 1.2. Calea metabolică a catabolismului lactozei și a biosintezei exopolizaharidelor la *S. thermophilus* [61]

În rezultatul activității microorganismelor după 3-4 ore aciditatea laptelui se micșorează la 1,0-1,2 g de acid lactic per 100 ml (pH 4,2-4,3). La această aciditate proteinele laptelui se coagulează, formând coagul ferm [86, 100].

Acumularea acidului lactic induce consecințe tehnologice deosebite, atât pentru procesarea materiei prime, cât și pentru definirea caracteristicilor nutritive, senzoriale și stabilitatea microbiologică a produsului finit, care se concretizează prin stimularea activității metabolice a microorganismelor utile și efectul său de conservant biologic.

Randamentul de producere a acidului lactic reprezintă principalul indicator al activității culturilor starter. Acest indicator este dependent, în primul rând, de proprietățile biotehnologice ale culturii starter, dar și de condițiile fizico-chimice și biologice în care aceasta trebuie să acționeze.

Cinetica procesului de acidulare depinde de viteza specifică de creștere a tulpinilor bacteriene și de caracteristicile nutriționale ale substratului. Se cunosc bacterii lactice care induc rapid fermentația, în timp ce la altele fermentația demarează mai greu.

Curbele cinetice de multiplicare și de formare a acidului lactic în primele faze ale ciclului vital la majoritatea bacteriilor lactice sunt similare. Însă, după un anumit timp, încep să difere, probabil datorită acumulării în mediu a acidului lactic cu efect inhibitor asupra activității fiziologice a celulelor [61].

Se consideră că acest comportament este rezultatul sensibilității celulelor bacteriene la stresul provocat de modificările din mediu pe parcursul glicolizei, de exemplu modificarea drastică a pH-ului. În unele cazuri, celulele transformă substanțele toxice în substanțe neutre. De exemplu, sunt capabile să transforme excesul de acid piruvic, care este toxic în diacetil și acetonă. În același mod, în cursul fermentației lactice, eliminarea acidului lactic din celulă este reglată de raportul $H^+/lactat$, dependent de pH și de diferența de potențial electrochimic al protonilor, concentrația cărora este mai mare la exterior. Dezvoltarea bacteriilor lactice depinde, de asemenea, de disponibilitatea nutrienților esențiali limitativi, cum sunt unii aminoacizi [61].

Laptele și produsele lactate fermentate sunt substraturi favorabile pentru creșterea microorganismelor de putrefacție care provoacă deteriorarea produselor. Cea mai cunoscută caracteristică a speciei *S. thermophilus* legată de proprietatea de conservare este capacitatea de a produce acid, care, la rândul său, are acțiune antimicrobiană. Acidularea protejează laptele de microorganismele dăunătoare și de dezvoltarea agenților patogeni.

S. thermophilus, fiind un producător activ al acidului lactic, realizează rapid procesul de fermentare, în plus temperatura de creștere optimală a acestei specii este în limitele 37-45 °C, temperatură necesară pentru unele tehnologii de fabricare a produselor lactate. De regulă, pH-ul final al iaurtului și al altor produse lactate fermentate, fabricate cu ajutorul speciei date este de 4,0-4,5 [16], ceea ce se consideră normal. Cantitatea de acid acumulat în produs, ce corespunde valorilor pH 4,0-4,5, trebuie să inhibe dezvoltarea microflorei străine [136]. Este de nedorit ca pH-ul produsului să se micșoreze până la valori mai mici de 4,0, deoarece acest lucru poate afecta microorganismele benefice din produsul finit. De asemenea, acidularea prea puternică reduce cantitatea de microorganisme viabile [75], și micșorează astfel beneficiul produsului asupra sănătății.

Deși cea mai mare parte a tulpinilor probiotice supraviețuiește chiar la hiperaciditate, la selectarea acestor tulpini bacteriene se ține cont de rezistența lor la valorile foarte scăzute ale pH-ului, caracteristice tractului gastro-intestinal uman [68]. Siguranța bacteriilor lactice din punct de vedere al rezistenței la acizi este necesară și pentru obținerea unui produs de calitate. Principalul mecanism de adaptare a celulelor bacteriilor lactice la mediul acid este funcționarea pompelor de protoni (ATF-aza care catalizează hidroliza adenozintrifosfat în adenazindifosfat). Cheltuielile energetice pentru transferul de protoni și acumulări de anioni ai acizilor organici la bacteriile lactice sunt mai mici decât la alte bacterii, care, probabil, este unul dintre avantajele acestui grup de bacterii în procesul de fermentare a laptelui. Rezistența la medii acide depinde și de decarboxilarea aminoacizilor în procesul de creștere, care duce la absorbția biochimică a protonilor. Cu toate acestea, contribuția acestui proces în reglarea pH-ului intracelular este neesențială [145].

Au fost efectuate studii privind menținerea vitalității speciilor de bacterii *S. thermophilus* în timpul trecerii prin tractul gastro-intestinal al omului și a altor mamifere [73]. S-a constatat că cea mai mare parte a celulelor de *S. thermophilus* se elimină din intestin, rămânând doar 1,2-2,2% din celule viabile consumate. Aceste valori sunt mai mari decât era de așteptat și indică că bacteriile lactice rezistă la acțiunea factorilor nefavorabili [97].

Activitatea proteolitică

Primele studii consacrate activității proteolitice a bacteriilor lactice au fost efectuate de Orla-Jensen în anul 1900 [131].

Spre deosebire de descompunerea totală a proteinelor din lapte sub influența microflorei patogene, bacteriile lactice realizează mai delicat proteoliza specifică, îmbogățind produsul cu aminoacizi valoroși, ce duce la creșterea valorii sale biologice. Hidroliza cazeinei din lapte sub acțiunea bacteriilor lactice începe imediat în primele ore și zile de cultivare [133].

Majoritatea bacteriilor lactice posedă un echipament proteolitic complex alcătuit din proteinaze și peptidaze. Această proprietate este extrem de benefică, deoarece bacteriile lactice prezintă auxotrofie față de principalii aminoacizi necesari dezvoltării lor, iar concentrația mică de aminoacizii liberi în lapte ($10 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) constituie doar 20% din necesități pentru activitatea optimă a acestora. Ca răspuns la această limitare, bacteriile lactice au dezvoltat un sistem complex de proteinaze și peptidaze, care le permite să utilizeze cazeina ca sursă suplimentară de azot organic [161].

Produsele de proteoliză a culturilor de *S. thermophilus* sunt arginina, histidina, leucina, fenilalanina [90, 100]. Concentrațiile aminoacizilor esențiali din lapte – acidul glutamic și metionina constituie $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ și $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectiv [81], ceea ce este mult mai inferior necesităților *S. thermophilus* - $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ și $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectiv [88].

În prezent, aplicarea tulpinilor de bacterii lactice proteolitice este considerată o strategie eficientă pentru producerea unor alimente funcționale noi, bogate în peptide bioactive [76].

În baza datelor din sursele de specialitate se știe, că culturile multiple de bacterii lactice au acțiune proteolitică mai mare decât o tulpină individuală [158]. La fabricarea produselor lactate fermentate de obicei se folosește o combinație de diferite specii și tulpini de bacterii lactice.

Proprietățile simbiotice ale microorganismelor sunt bazate pe asigurarea reciprocă cu aminoacizi și vitamine. De exemplu, cultura *Lactobacillus bulgaricus*, formând aminoacizii: valina, glicina, histidina, stimulează dezvoltarea culturii *S. thermophilus*. La rândul său arginina, histidina, leucina, fenilalanina sunt aminoacizi obținuți în urma proteolizei realizate de tulpinile de *S. thermophilus* [168].

La păstrarea produselor lactate fermentate, cum ar fi bunăoară smântâna fermentată sau iaurtul, activitatea proteolitică a culturilor utilizate la fabricare trebuie să fie slabă sau nulă, pentru prevenirea mirosului și gustului amar [158], pe când pentru fabricarea chefirului, airanului sau a cumâsului se folosesc culturi cu activitate proteolitică înaltă [164].

Biosinteza exopolizaharidelor de către bacteriile lactice

În ultimii ani o atenție deosebită se acordă selectării culturilor starter de bacterii lactice producătoare de exopolizaharide (EPS), care pot fi nu numai o sursă alternativă naturală de aditivi alimentari, ce îmbunătățesc parametrii reologici ai produselor lactate fermentate, dar și factori importanți ce contribuie la adeziunea microorganismelor probiotice la pereții intestinali [38].

Exopolizaharidele joacă un rol important în fabricarea produselor lactate (iaurtul, smântâna fermentată, brânza), îmbunătățind semnificativ textura și stabilitatea produsului final, ceea ce mărește și termenul de valabilitate. Cu ajutorul culturilor producătoare de EPS se reduce sinereza (separarea zerului) iaurtului și a smântânii fermentate [45]. EPS-le dispun de molecule hidrofile ce leagă apa liberă, ceea ce face produsul final mai puțin sensibil la sinereză [74].

Majoritatea EPS-urilor bacteriene sunt sintetizate intracelular și transportate în mediul extracelular [118]. Există câteva excepții cunoscute, de exemplu, levanul și dextranul, a căror sinteză și polimerizare au loc în mediul extracelular sub acțiunea enzimelor corespunzătoare [120].

Biosinteza EPS-urilor bacteriene constă din următoarele etape: absorbția substratului, calea centrală a metabolismului și sinteza polizaharidelor (Figura 1.3).

Secreția EPS-lor este un proces dificil pentru bacterii în care polimerii hidrofilii cu greutate moleculară mare, asamblați în citoplasmă, trebuie să traverseze peretele celular, fără a-i compromite critic proprietățile de barieră. În pofida diversității mari a structurilor moleculare ale EPS-lor, căile de biosinteză și de export urmează unul din cele două mecanisme: calea dependentă de Wzx-Wzy, în care polimerul – unitatea repetată este asamblat pe suprafața interioară a membranei citoplasmice și polimerizată în periplasmă și calea dependentă de transportatorul ABC, în care polimerizarea are loc pe suprafața citoplasmică a membranei interioare (figura 1.3d) [57].

Exopolizaharidele bacteriilor lactice pot fi clasificate în două grupe: homopolizaharide și heteropolizaharide [15].

Homopolizaharidele cuprind mai multe grupe de compuși dintre care cei mai importanți sunt α -D-1,6-glucanii (de exemplu dextranul) produși de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* și *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*; β -D-glucanii ce conțin resturi de glucoză legate β -1,2-, β -1,3- și β -1,6-monoglicozidic în catene lineare periodice sau ramificate, fiind produși de specii de *Pediococcus*, *Streptococcus* și *Sclerotium*.

Heteropolizaharidele sunt mai numeroase (circa 260 de structuri diferite). Aproape fără excepție, acestea sunt biopolimeri ramificați, constituiți dintr-o catenă principală tipică de (polioză de tip glucan, manan, galactan, fructozan sau cu unități periodice mixte de galactomanan, glucomanan etc.) Sunt sintetizate de diverse bacterii mezofile, cum ar fi *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* și bacterii termofile, cum sunt de exemplu *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* și *Lactobacillus helveticus* [85].

Exopolizaharidele bacteriilor lactice sunt formate din unități repetitive ce conțin grupări de manoză și/sau β -monoglicozidice cu unități monomere identice sau diferite [85]. Heteropolizaharidele conțin obligatoriu D-galactoza, D-glucoza și L-ramnoza. La unele tulpini de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* și *S. thermophilus* ramnoza lipsește, iar EPS-le izolate din bacterii lactice mezofile și termofile sunt compuse din galactoză și glucoză în proporție de 2:1. La *S. thermophilus* s-au identificat două heteropolizaharide cu aceeași compoziție de monomeri (D-galactoză și D-glucoză în raport molar 4:1), dar cu mase moleculare diferite, ceea ce influențează viscozitatea soluțiilor [46].

S-a demonstrat că numărul de EPS sintetizate depinde de tulpină și proprietățile ei specifice, precum și de condițiile de cultivare. Cu toate acestea, până în prezent nu există o opinie științifică comună despre influența compoziției mediului nutritiv asupra sintezei EPS-lor de către bacteriile lactice. Tulpina *S. thermophilus* LY03 sintetizează două tipuri de EPS

concomitent, proporția lor fiind strict dependentă de raportul de carbon-azot în mediul de cultivare [61]. În general, randamentul EPS la majoritatea tulpinilor *S. thermophilus* variază de la $0,2 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ la $60 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ în mediu pe bază de lapte în condiții optime și capacitatea de sinteză a EPS este individuală pentru fiecare tulpină a aceleiași grupe taxonomice [124].

Davy și O'Toole au studiat în detalii capacitatea diferitor microorganisme de a produce EPS în funcție de pH-ul mediului de cultivare, temperatură și activitatea apei. Toți acești factori influențează fixarea EPS-lor la matricea biofilmului, care, fie rămâne strâns atașat de celulă, fie apare liber în mediul fermentativ (cazul xanthanului și scleroglucanilor) [60].

Biofilmul EPS-lor acționează ca un stabilizator contribuind la consolidarea structurii coagulului, asigurând și o structură mai fină, o vâscozitate mai mare, concomitent cu prevenirea spargerii gelului și eliminarea zerului. Acest efect se datorează creșterii capacității de legare a apei. Dar producerea excesivă a EPS-lor poate influența negativ asupra consistenței produselor lactate fermentate. Nu numai cantitatea de EPS dar și tipul monomerului din structura acestora influențează vâscozitatea. Însă este dificil de stabilit o corelație strânsă dintre cantitatea de polizaharide produse și vâscozitate [60].

Ayala-Hernandez ș. a. consideră că EPS-le bacteriilor lactice, având sarcină negativă, pot influența agregarea proteinelor și în consecință proprietățile fizice ale gelului și ale produsului final după agitare. Tipul culturii bacteriene influențează, de asemenea, permeabilitatea gelurilor, o permeabilitate mai redusă fiind constatată în cazul culturilor filante, EPS-le având o contribuție la acest efect. Cantitativ, permeabilitatea și vâscozitatea aparentă a gelurilor supuse omogenizării par a fi într-o relație inversă [39].

Concentrația de polizaharide și compoziția acestora sunt influențate de condițiile de dezvoltare și tipul tulpinii bacteriene. Întrucât tulpina dezvoltată pe glucoză produce o cantitate mai mare de EPS decât pe substrat de fructoză, se poate considera că viteza de multiplicare, respectiv concentrația de celule producătoare de EPS, depinde de natura carbohidratului [60].

Zehra Nur Yuksekdağ ș. a. au ajuns la concluzia că pentru aceeași tulpină de bacterii lactice, sursa de carbohidrați influențează creșterea, dar nu și compoziția EPS-lor, cel puțin pentru zaharurile obișnuite [125].

Culturile starter producătoare de EPS sunt utilizate la fabricarea produselor lactate fermentate pentru îmbunătățirea vâscozității, prevenirea sinerezei, creșterea consistenței gelului și minimizarea efectelor negative ale proceselor de pompare și amestecare în mașinile de dozat și ambalat. Tulpinile de bacterii producătoare de EPS sunt utilizate pe cale largă în Franța, Olanda și Australia datorită popularității produselor naturale, interdicției folosirii stabilizatorilor și agenților de îngroșare și prețurilor ridicate ale acestora [56].

Culturile producătoare de EPS sunt utilizate la fabricarea iaurtului, a laptelui scandinav vâscos (viili), laptelui acru și a chefirului. Tulpinile de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* și *S. thermophilus* care produc EPS sunt folosite la obținerea iaurtului, în special a celui fluid. În acest caz amestecul este încălzit 0,5 ore la 85°C pentru denaturarea proteinelor zerului, în special a β -lactoglobulinei, care se cuplează cu k-caseina formând coprecipitatul [91].

Când pH-ul laptelui scade până la 4,62 (punctul izoelectric al cazeinei) datorită formării acidului lactic, micellele de cazeinat de calciu se precipită, formându-se un gel (coagul). În structura acestuia există spații care conțin zer și care conferă matricei proteice proprietăți visco-elastice. Reținerea zerului prezintă importanță pentru integritatea produsului atât în cazul iaurtului clasic, cât și a iaurtului de băut. Sinereza zerului se produce la pomparea sau amestecarea coagulului îndeosebi la fabricarea iaurtului cu fructe. Pentru a preveni sinereza, iaurtul coagulat se prepară cu concentrații mai ridicate de stabilizatori (0,7%), față de nivelul normal de 0,3%. Stabilizatorii se adaugă în produse pentru a le îmbunătăți consistența și viscozitatea și pentru a lega apa liberă în scopul prevenirii sinerezei zerului.

Stabilizatorii sunt hidrocoloizi de origine animală sau vegetală: gelatina, pectina, carboximetilceluloza ș.a. Acești hidrocoloizi sunt modificați pentru a îmbunătăți proprietățile funcționale în laptele fermentat, astfel afectând gustul și aroma produselor finite. Cu scopul de a realiza efecte de îngroșare corespunzătoare, polimerul hidratat trebuie să dispună de proprietăți tixotrope sau pseudoplastice (viscozitatea scade prin agitare pentru o decantare mai ușoară și revine la starea inițială când acțiunea mecanică încetează). Viscositatea trebuie să fie stabilă într-un interval larg de pH, rezistență ionică și temperatură.

Iaurtul de băut este preparat din iaurt cu un conținut redus de substanță uscată. Textura iaurtului de băut se modifică datorită acțiunii mecanice asupra produsului, ceea ce necesită folosirea culturilor starter producătoare de EPS care asigură o structură stabilă.

În acest sens, Lavezzari și colab. deosebesc tulpinile de bacterii lactice producătoare de EPS conform clasificării din Figura 1.4.

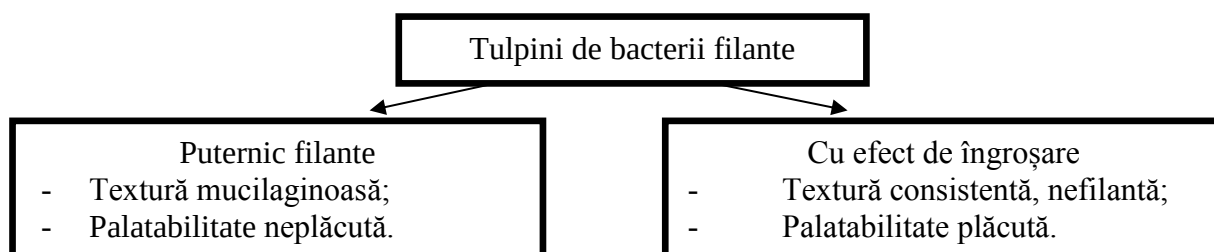


Fig. 1.4. Clasificarea practică a tulpinilor de bacterii lactice producătoare de EPS [115]

Tulpinile puternic filante generează produse cu aspect neplăcut la prelingere din lingură (de aceea s-a introdus testul analizei senzoriale din lingură); o senzație similară apare la masticăție când coagulul este lipicios și aderent la palatin. Valoare individuală au numai tulpinile din grupa "*thickening*", celelalte vor fi folosite doar în culturi mixte după testări prealabile în condiții de producție [103].

Culturile starter producătoare de EPS pot fi utilizate atât pentru producerea iaurtului de băut cât și a iaurtului cu conținut redus de substanță uscată și lipide sau chiar pentru fabricarea iaurtului degresat. Acest tip de culturi formează o textură mai consistentă (legată), o viscozitate mai mare și îmbunătățesc structura produsului, previn spargerea gelului și eliminarea zerului. Viscozitatea obținută prin fermentarea cu bacterii formatoare de EPS contribuie la adezivitatea produsului fluid, iar rezistența și elasticitatea coagulului sunt rezultatul interacțiunilor prin legături de tip proteină-proteină [34].

S-a constatat că la 43°C există o interacțiune mai puternică între bacterii, EPS și proteine decât la 32°C, temperatura de termostatare a iaurtului fiind 42-43°C. Iaurtul obținut cu ajutorul culturilor vâscoase are o structură mai deschisă, cu pori largi și un coagul mai moale, în timp ce iaurtul cu culturi starter nevâscoase are o structură mai rigidă. Iaurtul fabricat cu utilizarea culturilor vâscoase are o viscozitate îmbunătățită însă nu și un coagul mai puternic, care poate fi obținut prin interacțiuni proteină-proteină realizate prin incorporarea unor proteine adiționale sau/și prin tratamentul termic al amestecului pentru iaurt. Formarea legăturilor proteină-proteină este prevenită parțial de prezența EPS-ilor. Tulpinile de bacterii producătoare de EPS prin activitatea lor fermentativă produc un coagul cu legături proteine-polizaharide [46].

Bacteriile producătoare de EPS sunt utilizate și la fabricarea smântânii fermentate și a produselor prelucrării prin batere, pentru a îmbunătăți proprietățile reologice, a preveni sinereza și a înlocui stabilizatorii. Cercetările întreprinse asupra laptelui acru, produs în țările nordice, obținut cu ajutorul culturilor producătoare de EPS au demonstrat o mai bună adezivitate și reducerea sinerezei în comparație cu produsele realizate cu ajutorul culturilor nefilante. Prin microscopie electronică s-a remarcat, că substanța vâscoasă realizează o rețea care leagă celulele bacteriene de matricea proteică [74].

1.2. Culturile starter, clasificarea și aspectele tehnologice de utilizare a lor la fabricarea produselor lactate fermentate

Noțiunea „cultură starter” sau maia bacteriană poate fi definită ca preparat microbian, format din cel puțin un microorganism, cu număr mare de celule viabile, care poate fi adăugat la materia primă în scopul producerii unui produs fermentat prin accelerarea și orientarea procesului de fermentare [103].

Utilizarea culturilor starter în industria laptelui permite intensificarea procesului de fermentație, reduce spațiile de producere și îmbunătățește siguranța alimentară a produsului [161].

În funcție de procedeul și tehnologia de obținere, culturile starter se împart în:

- culturi bacteriene – pentru utilizarea lor în producere nu este nevoie de concentrarea bacteriilor. Ele conțin maximum 10 miliarde UFC în 1 cm³ de suspensie;
- concentrate bacteriene – se obțin prin concentrarea biomasei bacteriilor, astfel încât unitățile formatoare de colonii în 1 cm³ de concentrat este minimum de 10 miliarde [138].

În funcție de starea fizică culturile starter se împart în:

- lichide;
- uscate;
- congelate;
- pe medii nutritive solide [93].

Culturile starter lichide reprezintă culturi pure, care se află în stare activă și sunt cultivate în lapte steril. Termenul de valabilitate a acestora este de 2 săptămâni la temperatura de depozitare de 4±2 °C. Activitatea acestor culturi scade rapid.

Pentru majorarea duratei de depozitare a culturilor starter, păstrarea activității și numărului de celule bacteriene viabile se produc culturi starter uscate, precum și concentrate bacteriene lichide și uscate. Concentratul bacterian uscat se prepară prin cultivarea bacteriilor lactice pe un mediu nutritiv, concentrarea lor prin centrifugare, plasarea într-un mediu protector și uscare prin pulverizare sau liofilizare.

Liofilizarea reprezintă un proces de uscare a bacteriilor prin eliminarea lichidului din celulele congelate în condiții de vid. Cea mai mare parte a lichidului din biomasa congelată se elimină la temperaturile negative. Scopul tehnic al acestui procedeu este de a asigura deshidratarea optimală a culturii bacteriene și obținerea preparatului uscat cu conținut rezidual de umiditate nu mai mare de 3,5 % și totodată de a păstra viabilitatea și proprietățile biotehnologice ale bacteriilor. Liofilizarea asigură supraviețuirea bacteriilor la 90% timp de 6 luni și chiar 2 ani [42, 80]. Pentru protejarea bacteriilor de condițiile nefavorabile în timpul sublimării în mediul protector pe baza de lapte se introduc substanțe cu caracter protector: glutamat de sodiu, glucoză, zaharoză, maltoză etc. Microorganismele sunt cultivate pe acest mediu, apoi se congelează la temperatura de până la – 40 °C. Procesul de uscare se efectuează la o temperatură aproximativ de – 35 °C sub vid. În timpul congelării microorganismele trec în stare de anabioză, fiind mai rezistente la acțiuni adverse în timp de păstrare [131].

Culturile starter de bacterii lactice utilizate în industria laptelui pot fi clasificate în mezofile și termofile. Bacteriile din componența culturilor starter mezofile cresc la temperatura de 25-

35°C, și sunt reprezentate de genurile *Lactococcus*, *Leuconostoc*, unele tulpini din genul *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ș. a. Culturile starter termofile, temperatura de creștere fiind de 40-50°C, cuprind culturile din genul *Streptococcus* și unele specii termofile din genul *Lactobacillus*. Culturile mixte sunt compuse din tulpini atât mezofile cât și termofile.

În funcție de numărul de specii de microorganisme, culturile starter pot fi de trei tipuri:

1. Culturi starter singulare care sunt formate numai din *Lactococcus lactis subsp. lactis* sau *Lactococcus lactis subsp. cremoris*: ambele culturi fiind homofermentative, produc acid lactic (L+) în proporție de 0,8%.

2. Culturile starter multiple prezintă amestecul a 5-6 tulpini selectate, ce nu sunt înrudite în aspectul bacteriofagilor caracteristici, cultivate separat până la etapa de cultură primară sau chiar până la etapa de cultură starter de producție, când se amestecă între ele. În aceste condiții, tulpinile nu se dezvoltă împreună decât cel mult timp de 10 generații, ceea ce face ca nici o tulpină să nu devină dominantă. De asemenea, culturile pot fi folosite mai multe luni în șir fără a-și pierde capacitatea de acidulare.

3. Culturile starter mixte sunt formate, de regulă, din două specii de bacterii lactice, care la rândul lor pot fi constituite din unul sau mai multe specii de lactobacili și dintr-o specie de streptococi. De exemplu, cultura starter termofilă pentru iaurt este formată din *Streptococcus thermophilus* și *Lactobacillus bulgaricus*. Între cele două microorganisme există un sinergism deosebit. *Lactobacillus bulgaricus* produce aminoacizi din cazeină care sunt necesari dezvoltării *Streptococcus thermophilus*, care la rândul lor favorizează dezvoltarea *Lactobacillus bulgaricus* prin producerea de acid formic și CO₂ [17].

Luând în considerare cantitățile considerabile de iaurt ce se fabrică pe plan mondial, este necesar să cunoaștem factorii care influențează activitatea optimală a culturilor pentru iaurt. Unul din acești factori, temperatura de incubare, trebuie să fie de 41-42°C (apropiată de temperatura optimală de dezvoltare a *Lactobacillus bulgaricus*). După 3 ore de incubare se ajunge la ~ 500 mil. bacterii/g, raportul dintre *Lactobacillus bulgaricus* și *Streptococcus thermophilus* fiind 1:1 [131].

Structura culturilor starter uscate mixte, produse la Institutul de Industrie a Laptelui și Cărnii (Rusia), conține lactococi și streptococi termofili СБК–СМ–МТН/В, ce contribuie la formarea unei consistențe omogene dense nevâscoase a produsului. Odată cu mărirea temperaturii de fermentare are loc accelerarea procesului de fabricare a produsului. Cultura mixtă formează acid lactic și substanțe aromatice [130].

Concentratul bacterian uscat compus dintr-o singură tulpină de *S. thermophilus* СБК–ТН/В oferă consistență nevâscoasă densă produsului și o aromă fină. Acesta se recomandă pentru producția laptelui acru, laptelui covăsit și altor băuturi fermentate. Un alt concentrat bacterian

uscat compus din *S. thermophilus* CBK–T vâscos oferă o consistență vâscoasă produsului și o aromă fină. Acesta este recomandat pentru producția de lapte acru, de lapte covăsit și de alte băuturi lactate. Pe când, concentratul bacterian uscat mixt pentru iaurt CBK–T Л6Б conține un consorțiu de culturi special selectate de *S. thermophilus* și *L. bulgaricus*. Compoziția contribuie la obținerea produsului de consistență vâscoasă densă cu un gust armonios. Cultura starter dată este destinată pentru fabricarea iaurtului și a altor băuturi fermentate, inclusiv alimente pentru copii [148].

Compania DANISCO (Danemarca) producătoare de culturi starter oferă culturi starter mixte, care conțin și tulpini din specia *S. thermophilus* pentru fabricarea brânzei Ceddar. Astfel compoziția uscată CHOOZIT series RA 020, compusă din *L. lactis*, *L. cremoris*, *S. thermophilus*, asigură un gust unic brânzei Ceddar; CHOOZIT series MR 800, compusă din *L. lactis*, *S. thermophilus* asigură acidularea intensivă a laptelui; CHOOZIT series RAF 070, compusă din *L. lactis*, *S. thermophilus*, *L. helveticus* redă produsului gust dulce și aromă autentică [59].

Culturile starter YO-MIX™ 495 dispun de un consorțiu format din *S. thermophilus* și *L. bulgaricus*. Cultura este destinată producerii iaurtului cu aromă fină, viscozitate ridicată, textură netedă și post- acidulare controlată [102].

O analiză comparativă a culturilor starter de la diferiți producători demonstrează, că în pofida similarității componenței specie-specifice a culturilor starter, calitatea produsului fabricat poate fi considerabil diferită. Acest lucru se datorează faptului că producătorii de culturi starter folosesc culturile selectate în diferite combinații în funcție de destinația produsului, bazându-se pe proprietățile fiziologice, biochimice și tehnologice a fiecărei tulpini [134]. Deși, compoziția culturilor starter fabricate de diferite companii producătoare este asemănătoare, relațiile dintre genurile, speciile și subspeciile de microorganisme utilizate nu sunt similare [158].

Bacteriile lactice din specia *S. thermophilus* prezintă interes atât din punct de vedere fundamental cât și aplicativ, prin argumentarea posibilității utilizării lor în diverse procese biotehnologice. Importanța industrială a bacteriilor lactice la fabricarea diverselor produse lactate fermentate, precum și la fermentarea legumelor și a cărnii, a inițiat o gamă largă de cercetări privind genetica, biochimia și biofizica acestui grup de microorganisme. Un interes deosebit în studiul bacteriilor lactice a apărut după descoperirea plasmidelor responsabile de proprietățile tehnologice importante ale culturilor, cum ar fi metabolismul lactozei, activitatea proteolitică, producerea bacteriocinelor, rezistența la bacteriofagi ș. A [92, 126].

În prezent, industria laptelui se confruntă cu problemele legate de fabricarea produselor lactate cu indici de calitate și securitate stabili. Una dintre dificultăți constă în faptul, că atât monoculturile utilizate , cât și culturile de bacterii starter mixte, au proprietăți variabile și instabile. Acest fapt poate reduce activitatea biotehnologică și modifica proprietățile benefice ale

microorganismelor, ce duce la încălcarea procesului de transformare biologică a materiei prime și la dezvoltarea microflorei străine. Toți acești factori afectează substanțial valoarea biologică, calitatea și siguranța alimentelor. În cazul produselor lactate fermentate cu caracteristici stabile, în termeni de calitate și siguranță este necesar să se aplice culturi de bacterii lactice genetic stabile sau preparate bacteriene capabile să asigure repetabilitatea proceselor biotehnologice [113].

Gustul specific, textura și alte proprietăți ale produselor lactate depind de tulpinile, care participă la procesul de fabricare. În ultimii ani a crescut interesul față de bacteriile lactice termofile, în mare măsură datorită dezvoltării industriei laptelui pe plan mondial cât și în Republica Moldova prin elaborarea și fabricarea produselor lactate fermentate noi, fapt ce necesită izolarea și selectarea tulpinilor noi de bacterii lactice de interes biotehnologic. Conform datelor statistice volumul de fabricare a produselor lactate fermentate în țara noastră este în creștere: 32 659 tone în anul 2015 față de 23 934 tone în anul 2008 [1].

Tulpinile de *S. thermophilus* se utilizează în monocultură la fabricarea laptelui covăsit. Laptele acru, iaurtul, smântâna fermentată fabricată prin tehnologie rapidă, laptele acidofil, brânzeturile cu pasta moale și tare se produc cu utilizarea culturilor starter mixte, în compoziția cărora de asemenea se regăsesc tulpini *S. thermophilus* [148].

Astfel, este evident că *S. thermophilus* participă la fabricarea unui sortiment vast de produse lactate fermentate, fapt ce evidențiază importanța izolării și selectării tulpinilor noi pentru fabricarea și diversificarea acestor produse.

Produsele lactate fermentate sunt considerate alimente dietetice și au proprietăți curative. Valoarea dietetică și alimentară a produselor lactate fermentate rezultă din faptul, că ele conțin toate substanțele nutritive din lapte într-o formă mai accesibilă pentru organism. Substanțele proteice suferă în procesul fabricării o hidroliză inițială, ceea ce determina accesibilitate mai mare și o digestie mai completă a acestora [17].

În Republica Moldova se fabrică un asortiment larg de produse lactate fermentate, dintre care iaurtul și laptele covăsit sunt printre cele mai preferate de consumatori. Conform Reglementării Tehnice, iaurtul este produsul lactat fabricat prin fermentarea laptelui de culturi starter de *S. thermophilus* și *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* sau culturi de *S. thermophilus* și orice specie de *Lactobacillus* [24]. *S. thermophilus* și *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* fac parte din culturile probiotice tranzitorii, care au un efect pozitiv asupra sănătății umane, dar nu supraviețuiesc în intestin [67]. De aceea acestea trebuie să fie prezente în alimentația zilnică a omului.

Bacteriile lactice sunt foarte pretențioase, iar creșterea și dezvoltarea lor în lapte este deseori limitată din cauza insuficienței nutrienților esențiali. Astfel, succesul procesului de

coagulare a laptelui este bazat pe simbioza tulpinilor din specia *S. thermophilus* și *L. bulgaricus*. Această relație pozitivă are un efect benefic asupra dezvoltării bacteriilor și producerea acidului lactic și a compușilor aromatici. Astfel, *S. thermophilus* produce acidul piruvic, acidul formic și CO₂, care stimulează creșterea *L. bulgaricus*. La rândul său, *L. bulgaricus* produce peptide și aminoacizi, care stimulează creșterea *S. thermophilus*, deoarece *S. thermophilus* are o activitate proteolitică mai slabă în comparație cu *Lactobacillus*. Aceste două microorganisme, prin simbioză, schimbă compoziția laptelui, astfel obținându-se un produs cu caracteristici definite. Crearea consorțiilor simbiotice dintre *S. thermophilus* și *L. bulgaricus* cu termen lung de păstrare este dificilă, minuțioasă și deseori imposibil de realizat [112].

Utilizarea consorțiilor active din microorganisme biologic compatibile, selectate pentru fermentarea deplină a componentelor din lapte este o condiție principală pentru dezvoltarea proceselor tehnologice și obținerea produselor lactate de înaltă calitate [44].

Caracteristicile structurale și organoleptice ale iaurtului sunt factori foarte importanți pentru selectarea tulpinilor de bacterii lactice și obținerea culturilor starter de calitate, care ar sta la baza produselor lactate cu diverse caracteristici organoleptice și nutriționale. În așa mod se poate crea un grup nou de produse lactate fermentate cu caracteristici nutritive îmbunătățite.

Numeroase publicații recente relatează faptul, că bacteriile lactice izolate dintr-o zona geografică sunt capabile se producă brânzeturi, caracteristice acestei zone, de o calitate mai înaltă comparativ cu culturile starter comerciale [47, 72]. Astfel, Carafa ș. a. au izolat tulpini sălbatice de bacterii lactice *L.lactis ssp. lactis* 68 și *S. thermophilus* 93, care pot fi utilizate drept culturi starter la fabricarea brânzeturilor tradiționale din zona montană a Italiei [47].

Feutry ș. a. au elaborat o cultura starter nouă, compusă din 4 tulpini de *L. lactis ssp. Lactis* (L7, L14O, L16, L24) și 2 tulpini de *L. lactis ssp. cremoris* (C9, C15) de fermentare spontană izolate din lapte de oaie. Brânzeturile obținute cu utilizarea acestei culturii starter au avut caracteristici senzoriale și parametri reologici comparabili cu brânzeturile obținute cu ajutorul culturii starter comerciale S1 (*L. lactis ssp. lactis* (L1, L8, L14S), *L.lactis ssp. lactis* biovar *diacetylactis* (D15), *L. lactis ssp. cremoris* (C3) și *S. thermophilus* (S15)) [70].

Metode de preparare a culturilor starter

Culturile starter sunt utilizate la fabricarea produselor lactate fermentate prin prepararea inoculului de producere sau prin inoculare directă în lapte sau smântână dulce. Introducerea directă este mai comodă, deoarece nu este nevoie de organizarea unei secții speciale pentru pregătirea maielelor, exclude posibilitatea contaminării maielelor cu microfloră patogenă și previne infectarea microflorei cu bacteriofagi [169].

Tehnologia generală de producere a concentratelor bacteriene include operațiuni de bază, cum ar fi pregătirea și sterilizarea mediului nutritiv, inocularea culturilor și acumularea biomasei, separarea biomasei de lichidul cultural, transferul concentratului bacterian în mediul protector, liofilizarea, ambalarea și depozitarea concentratului uscat.

Selectarea mediului de cultură pentru cultivarea microorganismelor reprezintă o etapă-cheie, deoarece poate influența aspectele economice ale procesului de producție. De regulă, se apelează la ingrediente puțin costisitoare care pot servi drept sursa de carbon, azot și fosfor. De cele mai multe ori, în calitate de surse complexe de carbon, azot și fosfor sunt utilizate hidrolizatele vegetale și unele subproduse rezultate din diferite industrii (melasă, zeruri etc.) [163]. Concentrația și echilibrul dintre elementele minerale și factorii de creștere constituie un alt element important al cultivării microorganismelor la nivel industrial.

Cultivarea microorganismelor poate fi realizată în sistem discontinuu, semicontinuu și continuu, în funcție de echipamentele utilizate și de metodele de prelucrare. Dezvoltarea microorganismelor în sistem discontinuu are loc în condiții nelimitative. După atingerea densității maxime în celule are loc proliferarea în condiții limitative de substrat. Cultivarea microorganismelor în sistem semicontinuu este astfel operat încât concentrația substratului limitativ este păstrată constantă prin aprovizionarea continuă. Cultivarea în sistem continuu presupune alimentarea continuă cu nutrienți și în același timp evacuarea din reactor a unei cantități echivalente de mediu de cultură [36].

În procesul de cultivare discontinuă în mediul de cultură se adăugă cultura de bacterii și procesul de multiplicare se efectuează până la acumularea în mediul respectiv a unui număr maximal de celule. Inițial, cultura crește în condiții de exces de nutrienți iar în procesul cultivării cantitatea lor scade treptat. Adesea, componentele mediului nutritiv sunt utilizate în mod inegal și unele dintre ele în procesul de dezvoltare a culturii pot limita acumularea biomasei. În același timp, în mediul dat se acumulează produse metabolice care au de asemenea, impact negativ asupra metabolismului și fiziologiei celulelor [155].

O influență semnificativă asupra creșterii și dezvoltării microorganismelor are concentrația ionilor de hidrogen (pH). pH-ul mediului nutritiv poate modifica activitatea enzimelor, care, la rândul lor, duc la o schimbare în activitatea biochimică a bacteriilor și la transformările biochimice în mediu. Majoritatea microorganismelor se dezvoltă la pH neutru sau ușor alcalin al mediului. Bacteriile lactice sunt rezistente la acizi, de exemplu, la acțiunea acidului lactic. La acidularea mediului până la pH 4,0 creșterea majorității bacteriilor, practic încetează. În mod normal, după sterilizare pH-ul mediului se schimbă, are loc alcalinizarea care rezultă din distrugerea carbonaților. Din aceste considerente în medii se adăugă sistemul-tampon pentru a preveni schimbarea pH-ului, cel mai frecvent utilizate fiind soluțiile tampon fosfat, constituite

din amestec de fosfați K_2HPO_4 și KH_2PO_4 . Aceste soluții de săruri anorganice sunt singurii compuși cu acțiune de tampon în intervalul de pH neutru, sunt practic inofensive pentru microorganisme și servesc drept sursă de fosfor.

În funcție de umiditate, densitate, mărimea particulelor solide și cerințele tehnologice concentrarea bacteriilor se efectuează prin două metode: microfiltrare și centrifugare.

Microfiltrarea se efectuează sub presiune cu ajutorul membranelor semipermeabile din materiale polimerice poroase sau anorganice. Centrifugarea, care este cel mai des utilizată, se efectuează în centrifugi speciale [66] la temperatură ce nu depășește $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ [166].

Un impact semnificativ asupra activității și stabilității concentratelor bacteriene, în opinia savanților, are durata de cultivare a bacteriilor lactice. Concentratele bacteriene obținute din celule separate în faza staționară sunt mai active și stabile comparativ cu cele obținute din celule în faza logaritmică [61].

Uscarea prin liofilizare (sublimare) se utilizează în industria laptelui pentru obținerea concentratelor bacteriene uscate [41]. Păstrarea microorganismelor în stare liofilizată se bazează pe principiul anabiozei. Anabioză este starea de încetinire temporară, reversibilă a proceselor biochimice în celula, din care microorganismul poate fi reactivat [131].

Procesul de liofilizare se divizează în două etape: congelare și uscare în vid. Uscarea la rândul său, de asemenea constă din 2 etape: îndepărtarea apei libere, ce se efectuează la temperaturi foarte joase și eliminarea apei legate, ce se petrece la temperaturi pozitive.

Avantajele acestui procedeu sunt următoarele: apa este îndepărtată la temperaturi scăzute în vid, ceea ce evită inactivarea termică a produsului: păstrează viabilitatea celulelor și facilitează obținerea produsului uscat și steril ambalat. Principalele dezavantaje ale procesului de liofilizare sunt durata mare a procesului, consumul de energie și complexitatea echipamentului pentru sublimare [157].

Congelarea este una din etapele cheie în procesul tehnologic de preparare a concentratelor bacteriene. Congelarea biomasei duce la modificări fizice, biofizice și biochimice în celula bacteriană. Ca rezultat al cristalizării apei, în timpul congelării are loc deteriorarea membranelor celulare și a altor structuri. Aceste deteriorări pot fi cauzate de trei factori principali: acțiunea mecanică a cristalelor de gheață asupra celulei; creșterea concentrației de electroliți, care provoacă denaturarea membranei; creșterea presiunii osmotice [121].

Un rol important în menținerea viabilității microorganismelor în timpul congelării și al uscării îl are mediul stabilizator cu efect de protecție. Mediul de protecție are un impact pozitiv asupra viabilității celulelor în timpul congelării. De regulă ele conțin lioprotectori, care protejează microorganismele de efectele dăunătoare ale congelării. Termenul „lioprotector” definește agenți care asigură stabilitatea celulei în cazul când se îndepărtează apa în timpul

uscării sau liofilizării [151]. Utilizarea lor reduce sau previne formarea cristalelor de gheață intracelulare [62].

Există numeroase substanțe cu proprietăți crioprotectoare, mecanismul de acțiune a cărora este de două tipuri: endocelular (permeabile) și exocelular (impermeabile). Agenții lioprotectori permeabili inhibă formarea cristalelor de gheață datorită formării legăturilor de hidrogen cu moleculele de apă. Cele mai utilizate sunt: glicerolul, propilenglicolul, etilenglicolul, dimetilsulfoxidul [122]. Principiul de funcționare al lioprotectorilor impermeabili încă nu este suficient studiat. Posibil, principiul de acțiune constă în reducerea ratei de creștere a cristalelor și protejarea celulelor de diferența presiunii osmotice. Lioprotectorii impermeabili se divizează în două grupe de substanțe: oligozaharide (zaharoză și trehaloză) și compuși cu masă moleculară mare, cum ar fi ficolalbumina sau polivinilpirolidona. În calitate de lioprotectori pot fi utilizate și următoarele substanțe: maltodextrina, sorbitolul, ascorbatul de calciu, glutamatul [105]. Utilizarea lioprotectorilor impermeabili fără cei permeabili este inefficientă, de aceea lioprotectori impermeabili sunt de regulă componenți adiționali ai mediilor stabilizatoare cu efect protector.

Regimul de păstrare influențează în mare măsură activitatea și viabilitatea concentratelor bacteriene congelate. Studiile indică, că la depozitarea concentratului de bacterii lactice într-un mediu protector timp de 6 luni la minus 18 °C s-au observat pierderi de viabilitate până la 9%, iar la temperatura de minus 8 °C pierderile constituie 16 - 28% [166].

Actualmente sunt cunoscute diverse procedee de obținere a concentratelor bacteriene liofilizate. De exemplu, Ilnițaia și coautorii propun o metodă de producere a concentratelor bacteriene uscate pentru produsele lactate fermentate, care prevede cultivarea tulpinii *L. acidophilus* Ep317/402 pe un mediu cu zer din lapte, extract de cartofi, sulfat de mangan și apă, ce conține adițional 9–11 ml/L lapte și 5,9 – 6,1 g/L acetat de sodiu. Cultivarea se realizează la pH 5,6 – 5,7, iar pH-ul concentratului obținut este de 6,5 – 7,5. După suspendarea concentratului obținut în mediul de protecție și distribuirea în flacoane, se realizează liofilizarea timp de 64 ore, cu temperatura finală de uscare de maximum 30 °C [149].

La fel, este cunoscută metoda de obținere a consorțiului de bacterii eubiotice, la etapa inițială a căreia se efectuează prepararea mediului nutritiv pe bază de lapte cu conținut de 13,5-15,0% SUD, suplementat cu glucoză (1,5-2,5 %) și citrat de sodiu (0,15-0,25 %). Apoi în mediul protector se adaugă consorțiul de bacterii și se termostatează până la formarea coagulului, aciditatea titrabilă este de minimum 90 °T. Produsul obținut se congelează la minus 40-45 °C timp de 24-48 ore. Apoi și se liofilizează la temperatura de minus 20-30 °C în vid. Conținutul de umiditate remanentă a concentratului bacterian este de maximum 3,0% [150].

O altă metodă de preparare a concentratului bacterian cu culturi lactice din specia *S. thermophilus*, presupune cultivarea tulpinilor separat. Apoi fiecare tulpină se transferă în

mediul protector în raport de 1:2 – 1:4. Mediul protector pentru *S. thermophilus* include lapte degresat 20%, zaharoză - 5%, gelatoză - 5%, citrat de sodiu - 2,2%, și glutamat de sodiu - 1,2%. Gelatoza reprezintă gelatină după sterilizare la presiunea de 0,15 MPa timp de 2,5-3,0 ore, în urma căreia își pierde capacitatea de a forma gel. Liofilizarea se efectuează separat. Pentru această suspensiile celulare obținute se toarnă în tavă cu grosimea stratului de 1-1,5 cm. Liofilizarea are loc la temperatura de minus 35-45 ° C, uscarea finală – la temperatura de 40-45 °C. Durata uscării este de 6-12 ore. Termenul de păstrare este de 18 luni la temperatura 12 °C [152].

1.3. Tehnologia de fabricare a produselor lactate fermentate

Succesul fabricării produselor lactate fermentate la scară industrială este direct legat de tehnologia de prelucrare a laptelui, de selectarea, păstrarea și manipularea corectă a culturilor starter. Toate acestea contribuie la obținerea produsului finit de calitate înaltă.

Datorită valorii dietetice-curative a produselor lactate fermentate, importanța cărora este tot mai evidentă în condițiile ecologice nefavorabile, aceste produse devin absolut necesare în alimentația populației de toate vârstele. În alimentația rațională se recomandă ca 40-50% din totalul de produse lactate lichide să fie consumate sub forma de produse lactate fermentate [17].

Proprietățile curative ale produselor lactate fermentate consta în faptul că acestea au un efect pozitiv asupra metabolismului, stimulează secreția sucului gastric și funcția intestinelor. O direcție de perspectivă este îmbunătățirea proprietăților nutriționale ale produselor lactate prin utilizarea culturilor special izolate și selectate de bacterii lactice, ce conferă proprietăți probiotice produsului [165].

Acțiunea benefică a produselor lactate fermentate asupra organismului uman depinde de proprietățile microorganismelor utilizate, ce asigură calitatea înaltă a produsului și efectul terapeutic curativ scontat.

Produsele lactate fermentate pot fi de patru tipuri diferite în dependență de microorganismele utilizate la fabricarea lor: (1) cu utilizare de tulpini de bacterii lactice mezofile; (2) cu utilizare de bacterii lactice termofile; (3) produse obținute prin fermentare alcoolică, cu implicarea drojdiilor și a bacteriilor lactice, și (4) produse obținute cu utilizarea mucegaiurilor [17].

Reglementarea Tehnică [24] definește produsele lactate fermentate ca produse care se caracterizează prin culturi starter specifice, aplicate la fermentarea laptelui, după cum urmează:

a) iaurt – produs lactat fabricat prin fermentarea laptelui cu o cultură starter mixtă ce conține 2 specii de bacterii termofile *Streptococcus thermophilus* și *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* sau *Streptococcus thermophilus* și orice specie de *Lactobacillus*;

b) lapte acidofil – produs lactat fabricat prin fermentarea laptelui cu ajutorul culturilor starter de *Lactobacillus acidophilus*;

c) chefir – produs lactat fabricat prin fermentarea laptelui cu utilizarea culturilor starter din granule de chefir, constituite din levuri care fermentează lactoza (*Kluyveromyces marxianus*) și care nu fermentează lactoza (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* și *Saccharomyces exiguus*), și culturi de *Lactobacillus kefir*, specii de bacterii din genul *Leuconostoc*, *Lactococcus* și *Acetobacter*, ce se află în relații simbiotice specifice;

d) cumâs – produs lactat acid cu proprietăți antibiotice, fabricat din lapte de iapă sau lapte de vacă degresat cu adaos de zahăr, prin fermentație mixtă (lactică și alcoolică) cu ajutorul culturilor starter de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* și *Kluyveromyces marxianus*;

e) lapte acru – produs lactat fabricat prin fermentarea laptelui cu utilizarea culturilor starter de lactococi mezofili;

f) lapte covăsit – produs lactat fabricat prin fermentarea laptelui înăbușit cu culturi starter de *Streptococcus thermophilus*, cu sau fără culturi de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

Deși produsele lactate fermentate sunt foarte variate atât după indicii organoleptici, cât și după indicii fizico-chimici, tehnologia de fabricare a acestora include multe operații similare, deosebirea referindu-se în special, la componența culturilor starter, utilizate la prepararea lor, tratamentul termic al materiei prime și regimul de termostatare.

Produsele lactate fermentate se fabrică prin două metode – 1) metoda la termosta (în ambalaj) și 2) metoda la rezervor, conform schemei tehnologice generale de fabricare expusă în Figura 1.5.

Pentru fabricarea produselor lactate fermentate se potrivește laptele cu aciditatea titrabilă max. 19 °T, densitatea 1027 kg·m³, lapte praf, lapte degresat și smântână dulce.

În prima fază a procesului tehnologic propriu-zis se urmărește îndepărtarea impurităților mecanice pătrunse în lapte pe diferite căi, înainte de umplerea bazinului de recepție, chiar dacă a fost filtrat la locul de producere (la fermă), după care este supus prelucrării. În funcție de tipul produsului fabricat, are loc normalizarea conținutului de grăsime al laptelui. Creșterea conținutului de grăsime se realizează prin: adăugarea de smântână dulce în lapte sau amestecarea unui lapte integral cu un conținut de grăsime mai scăzut cu altul mai gras. Scăderea conținutului de grăsime se realizează prin: extragerea unei cantități de grăsime din lapte prin centrifugare; amestecarea laptelui integral cu lapte degresat.

Laptele recepționat cantitativ și calitativ se supune normalizării după conținutul de grăsime. Calculul cantitativ al fracției de grăsimi se efectuează după formula (1.1):

$$G_{LN} = \frac{G_p \cdot 100}{100 - a}, \quad (1.1)$$

unde

G_{LN} – fracția de grăsimi în laptele normalizat, %;

G_p – fracția de grăsimi, %;

a – norma introducerii bacteriilor lactice pe bază de lapte degresat, %.

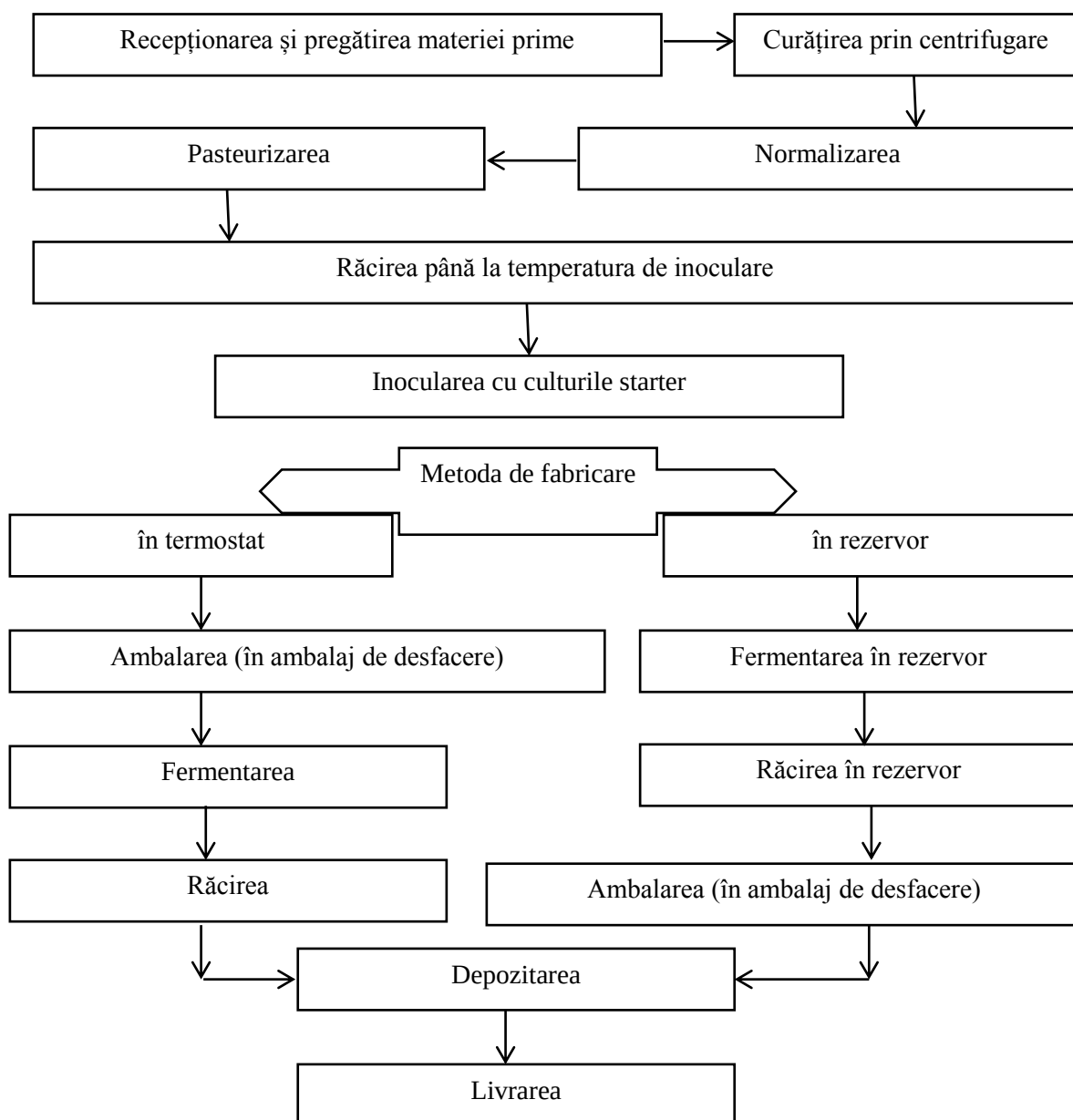


Fig. 1.5. Fluxul tehnologic general de fabricare a produselor lactate fermentate [17].

Normalizarea laptelui întotdeauna trebuie să fie precedată de analiza laptelui din punct de vedere al conținutului de grăsime. Amestecul normalizat se omogenizează.

Omogenizarea este o operație tehnologică care are drept scop stabilizarea emulsiei de grăsime în materia primă pentru evitarea separării grăsimii la suprafața produsului finit și obținerea unei consistențe cât mai omogene. Omogenizarea laptelui se realizează cu ajutorul unor utilaje speciale, denumite omogenizatoare. Omogenizarea are un efect pozitiv și în cazul fabricării produselor cu un conținut redus de grăsime. Pentru a obține o dispersare mai puternică a globulelor de grăsime, se practică omogenizarea în două trepte, adică mai întâi laptele se omogenizează la o presiune mai înaltă, apoi la o presiune mai joasă. Ca rezultat a omogenizării crește viscozitatea laptelui, culoarea din alb-gălbuie trece în alb, laptele devine mult mai opac datorită repartizării mai uniforme a grăsimii [17].

Pentru fabricarea iaurtului, laptele se pasteurizează. Prin această operație tehnologică se distrug formele vegetative ale microorganismelor și parțial a celor aflate în stare sporulată. În funcție de temperatură și de durată, metodele de pasteurizare aplicate laptelui sunt:

- *pasteurizarea joasă sau de durată* – se realizează la temperatura de 63-65° C timp de 30 de minute. Este o metodă lentă, discontinuă. Această metodă prezintă avantajul că nu modifică aproape deloc proprietățile laptelui. Ca dezavantaj se menționează că necesită în afară de pasteurizare și tancuri de răcire pentru menținerea laptelui la temperatura de pasteurizare o anumită perioadă de timp și nu asigură distrugerea unor specii de bacterii termostabile. Se aplică laptelui destinat fabricării brânzeturilor;

- *pasteurizarea înaltă de scurtă durată* – prevede încălzirea laptelui la 72-76° C timp de 15-20 sec. Este un procedeu rapid și continuu, dar modificările în compoziția și proprietățile laptelui sunt mai profunde, se denaturează până la 50% din albumină, 15-20% globulină, se insolubilizează 3-4% din substanțele minerale, majoritatea enzimelor sunt inactivate, scade considerabil puterea de coagulare a cazeinei sub acțiunea cheagului. Pasteurizarea înaltă de scurtă durată se aplică la obținerea laptelui de consum.

- *pasteurizarea instantanee* – se realizează prin încălzirea materiei prime la temperatura de 85-90 °C și chiar mai mare fără menținerea produsului la această temperatură. Modificările în compoziția și proprietățile laptelui se intensifică; se denaturează toate enzimele, albumina și circa 75-85% din globulină, o parte considerabilă de calciu se precipită. Acest regim este utilizat la fabricarea smântânii, untului, laptelui concentrat;

- *pasteurizarea după un regim special* – se efectuează la temperatura de 95-98° C cu menținerea laptelui la această temperatură timp de 2-8 minute. După acest procedeu se pasteurizează laptele destinat produselor lactate acide dietetice. Această metodă provoacă modificări și mai profunde în compoziția laptelui, dar permite obținerea unei consistențe dense a coagulului produselor lactate acide, se distruge toată microflora vegetativă termostabilă, fapt ce se răsfrânge pozitiv asupra dezvoltării microflorei favorabile introduse prin culturile starter.

Aplicarea acestui regim de pasteurizare se face cu scopul de a distruge toate formele de microorganisme posibile: a bacteriilor dăunătoare precum și a microflorei normale a laptelui, format din bacterii lactice, drojdii și mucegaiuri, creându-se astfel condiții favorabile pentru dezvoltarea bacteriilor lactice selecționate cu care laptele se înoculează. De asemenea, prin încălzire la temperaturi înalte, o parte din substanțele proteice ce se conțin în lapte se precipită, iar fosfații și citrații solubili devin parțial săruri insolubile, ceea ce determină o îmbunătățire a consistenței produsului prin obținerea unui coagul mai dens. Din aceste motive, este foarte important să se respecte regimul de pasteurizare prevăzut și măsurile de igienă necesare pentru prevenirea contaminării ulterioare a laptelui cu diferite bacterii [16].

În scopul evitării modificărilor nedorite în compoziția laptelui, el este răcit la 2-4° C imediat după pasteurizare.

Pentru fermentarea laptelui și obținerea produsului cu proprietăți specifice, laptele se înoculează cu o cultură starter ce are în componența sa bacterii lactice care asigură coagularea laptelui în cel mult 4-6 ore [17]. Fermentarea laptelui este una dintre cele mai importante faze ale procesului de fabricare și rezidă în crearea condițiilor de temperatură corespunzătoare pentru dezvoltarea microflorei specifice ce produce fermentarea și coagularea laptelui. În cazul fermentării în termostat laptele inoculat se ambalează în ambalaj de desfacere, se etichetează și plasează în termostat pentru fermentare timp de 2,5-3 ore la temperatura de 42-45°C, timp în care se produce coagularea laptelui. În cazul fermentării în rezervor, un aspect deosebit de important al fermentării laptelui, este consistența produsului obținut. În cazul fermentării în ambalaj, consistența va fi de „coagul compact”, pe când la fermentarea în rezervor, va fi „coagul fluid” datorită agitării înaintea ambalării. De asemenea, atunci când ambalarea se face în pungi de plastic sau ambalaje de capacitate mai mare, procesul tehnologic impune efectuarea fermentării laptelui în rezervor, după care se trece în ambalajele respective [16].

Pentru a preveni creșterea acidității peste limita admisă la eliminarea zerului, este necesar ca produsul să fie cât mai repede răcit. Operațiunea se realizează în două faze, respectiv răcirea prealabilă la temperatura de 18-20°C, prin ventilarea aerului din termostat (neîncălzit), după care se face răcirea profundă, la temperatura de 2-6°C, în camera frigorifică [16, 17].

1.4. Concluzii la capitolul 1

1. Creșterea volumului de fabricare a produselor lactate fermentate și lipsa culturilor starter de bacterii lactice autohtone, argumentează necesitatea și evidențiază actualitatea cercetărilor orientate spre izolarea din sursele naturale, identificarea și selectarea bacteriilor lactice de interes biotehnologic pentru industria laptelui.

2. Pentru obținerea unor produse lactate naturale, este necesar de a izola și selecta tulpini de bacterii lactice cu proprietăți deosebite, cum ar fi sinteza exopolizaharidelor, fapt ce ar permite de a evita utilizarea sistemelor de stabilizare pentru îmbunătățirea proprietăților reologice și texturale ale produsului.
3. Pentru a obține culturi starter active și stabile pe termen lung este necesar de a elabora medii protective eficiente, care asigură viabilitatea înaltă și păstrarea proprietăților biotehnologice valoroase a bacteriilor lactice după liofilizare.
4. Pentru asigurarea calității înalte a produselor lactate fermentate este necesar de a crea culturi starter care asigură fermentarea laptelui în timp scurt, au capacitatea de a preveni fenomenul de sinereză și posedă nivel scăzut de post-acidulare.

Analiza surselor bibliografice relevante la tema tezei a permis de a formula **problema de cercetare** care a fost pusă în fața acestei lucrări: necesitatea selectării și descrierii unor tulpini noi de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* în scopul elaborării culturilor starter autohtone cu potențial biotehnologic înalt pentru industria de procesare a laptelui în vederea eficientizării procesului de fabricare a produselor lactate fermentate.

Direcțiile de rezolvare a problemei de cercetare au constat în următoarele: realizarea screening-ului tulpinilor de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* izolate din lapte și produsele lactate de fermentare spontană din R. Moldova în scopul obținerii culturilor active din punct de vedere biotehnologic; asocierea simbiotică a tulpinilor selectate în culturi starter și utilizarea lor în procesul de fabricare a produselor lactate fermentate.

Scopul lucrării a constat în izolarea, identificarea și evaluarea caracteristicilor fiziologo-biochimice și biotehnologice ale unor tulpini noi de *S. thermophilus*, selectate în vederea elaborării culturilor starter autohtone și utilizării lor la fabricarea produselor lactate fermentate.

Obiectivele cercetărilor au fost următoarele:

1. Izolarea în cultură pură a bacteriilor lactice tipice speciei *S. thermophilus* din lapte și produsele lactate de fermentare spontană din diferite zone ale R. Moldova;
2. Identificarea fenotipică și genotipică a tulpinilor izolate și evidențierea tulpinilor cu potențial biotehnologic înalt pentru industria laptelui;
3. Stabilirea parametrilor optimi de cultivare și păstrare a tulpinilor producătoare de exopolizaharide din specia *S. thermophilus* în condiții industriale;
4. Elaborarea și testarea în condiții de producere a culturilor starter autohtone în baza asociațiilor mixte de tulpini noi de bacterii lactice pentru fabricarea lactatelor fermentate.

2. OBIECTELE DE STUDIU ȘI METODELE APLICATE ÎN CERCETARE

Cercetările științifice destinate izolării, identificării și selectării bacteriilor lactice din specia *Streptococcus thermophilus* de interes biotehnologic au fost efectuate în perioada anilor 2011-2016 în laboratorul de Biotehnologii alimentare din cadrul Direcției „Tehnologii Alimentare” a Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare (IȘPHTA) din Republica Moldova. Identificarea moleculară a bacteriilor lactice selectate a fost efectuată în Departamentul de microbiologie, biologie moleculară și biotehnologie a Institutului de Cercetare a Alimentelor din cadrul Centrului Național de Agricultură și Produse Alimentare din Bratislava, Slovacia (Anexa 1).

2.1. Obiectele de cercetare

În calitate de obiecte de cercetare au servit tulpini autohtone de bacterii lactice izolate din probe de lapte și produse lactate de fermentare spontană din Republica Moldova și tulpini de referință depozitate în diverse Colecții de Microorganisme, după cum urmează:

2.1.1. *Tulpinile autohtone de Streptococcus thermophilus* au fost izolate din habitat natural – lapte crud și produse lactate de fermentare spontană, din diferite regiuni ale Republicii Moldova, identificate și depozitate ulterior în Colecția Națională de Microorganisme Neputogene din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM și în Colecția Ramurală a Laboratorului de Biotehnologii Alimentare IȘPHTA. Schema izolării și studierii izolatelor naturale în scopul valorificării lor în biotehnologia produselor lactate este prezentată în Figura 2.1.

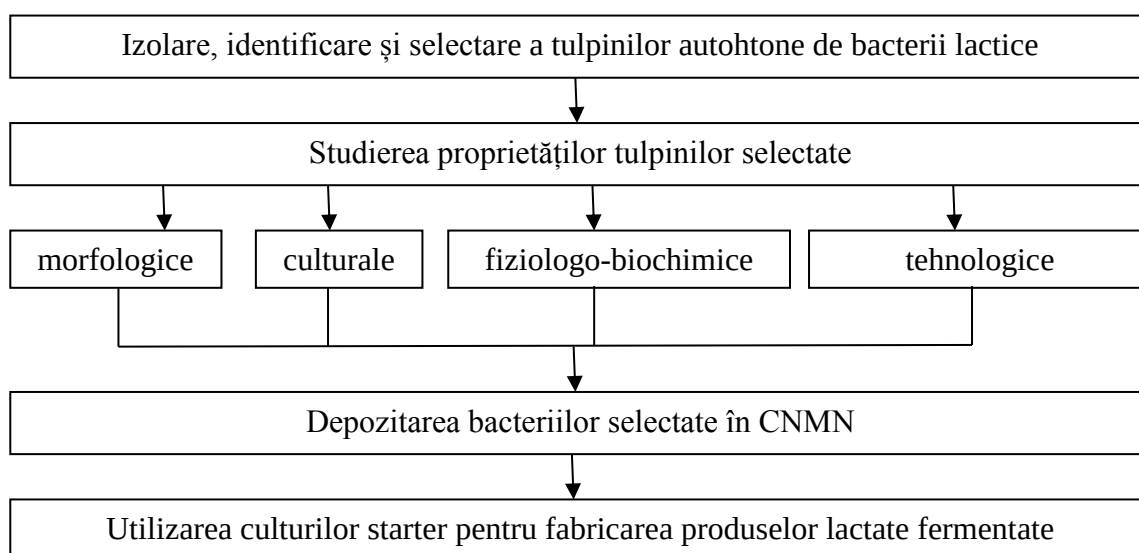


Fig. 2.1. Schema cercetărilor asupra izolatelor naturale de bacterii lactice.

Izolarea culturilor pure de microorganisme lactice din specia *S. thermophilus* s-a efectuat prin inoculări periodice (de 10-15 ori) în lapte degresat steril până la formarea coagulului dens.

Fiecare probă a fost însămânțată în 6 eprubete, dintre care 2 au fost incubate în termostat la 30 °C, 2 – la 37 °C și 2 – la temperatura de 45 °C.

Selectarea tulpinilor autohtone de *S. thermophilus* a fost efectuată în conformitate cu schema prezentată în Figura 2.2.

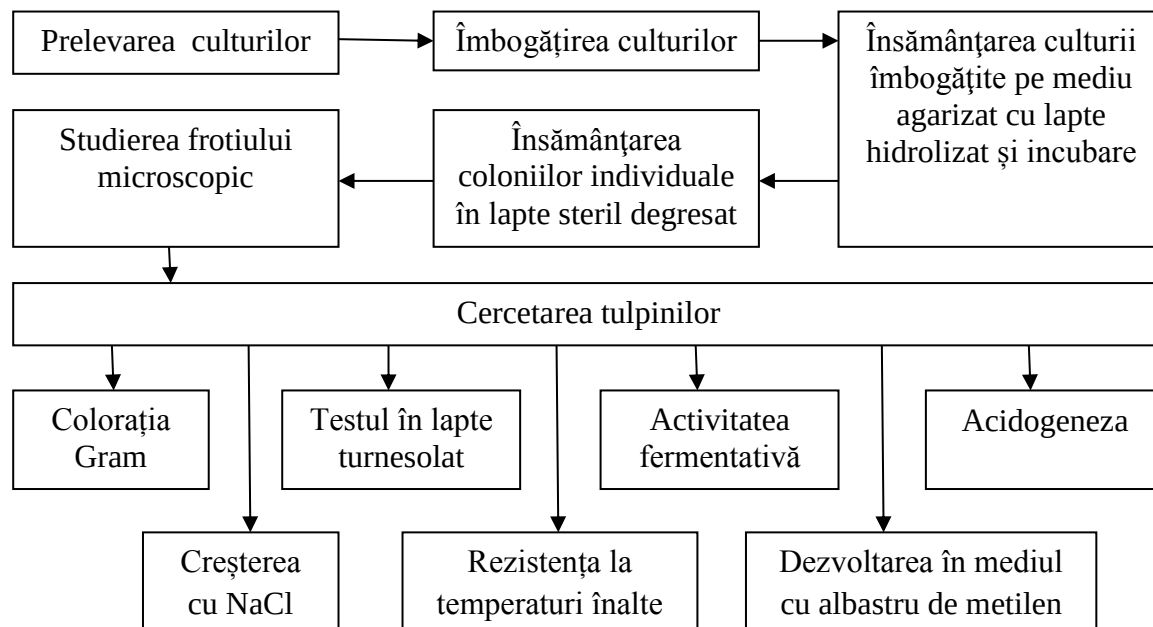


Fig. 2.2. Schema etapelor de selectare a tulpinilor de *S. thermophilus* de importanță biotehnologică pentru industria produselor lactate.

Descrierea detaliată a izolatelor bacteriene obținute sunt prezentate în capitolul 3 "Selectarea tulpinilor autohtone noi de *Streptococcus thermophilus*". În baza tulpinilor autohtone selectate au fost elaborate **culturile starter YO1, YO2 și YO3**, care au constituit un obiect de studiu aparte. Aceste culturi starter au servit la fabricarea în condiții industriale a **mostrelor de iaurt**, proprietățile cărora au fost studiate în capitolul final al lucrării.

2.1.2. *Tulpina de referință pentru cercetări moleculare – Streptococcus thermophilus A737* obținută din Colecția Cehă de Microorganisme, Brno, Republica Cehă.

Poziția sistematică: Domeniul Bacteria, Regnul Eubacteria, Filumul Firmicutes, Clasa Bacilli, Ordinul Lactobacillales, Familia Streptococcaceae, Genul *Streptococcus*, Specia *Streptococcus thermophilus* (Orla-Jensen 1919)

Tulpina posedă următoarele caracteristici: bacterii gram-pozitive, facultativ anaerobe, prezintă coci plasați în lanțuri de diferite lungimi, celule de formă sferică, temperatura optimă de creștere 37-40 °C, metabolizează lactoză cu formarea acidului lactic, aciditatea limită 115-120 °T (pH 4,5), nu se dezvoltă în prezența NaCl 4%;



Fig. 2.3. Aspectul microscopic al *S. thermophilus* A737

Microscopie fonică, puterea de mărire 100x (Autor Cartașev A.).

2.1.3. *Tulpina de referință pentru cercetări moleculare – Streptococcus thermophilus 1241* obținută din Colecția de Microorganisme a Departamentului de microbiologie, biologie moleculară și biotehnologie al Institutului de Cercetare a Alimentelor din cadrul Centrului Național de Agricultură și Produse Alimentare din Bratislava, Slovacia. Tulpina posedă proprietăți caracteristice speciei *S. thermophilus*. Aspectul microscopic al tulpinii este prezentat în Figura 2.4.

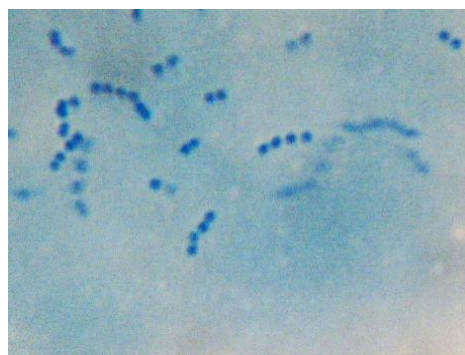


Fig. 2.4. Aspectul microscopic al *S. thermophilus* 1241

microscopie fonică, puterea de mărire 100x (Autor Cartașev A.).

2.1.4. *Tulpina de referință pentru cercetări moleculare Lactobacillus casei 4791*, obținută din Colecția de Microorganisme a Departamentului de microbiologie, biologie moleculară și biotehnologie al Institutului de Cercetare a Alimentelor din cadrul Centrului Național de Agricultură și Produse Alimentare din Bratislava, Slovacia.

Poziția sistematică: Domeniul Bacteria, Regnul Eubacteria, Filumul Firmicutes, Clasa Bacilli, Ordinul Lactobacillales, Familia Lactobacillaceae, Genul *Lactobacillus*, Specia *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1919).

Aspectul tulpinii: prezintă bacili de forma și lungime diversă, Gram-pozitivi, facultativ anaerobi, nu formează spori, celule sunt imobile. Formează coagulul în lapte după 48 ore la temperatura de 30°C, nu formează CO₂ și citrat de sodiu, rezistent în mediul cu NaCl de concentrație 6%. Aspectul microscopic este prezentat în Figura 2.5.

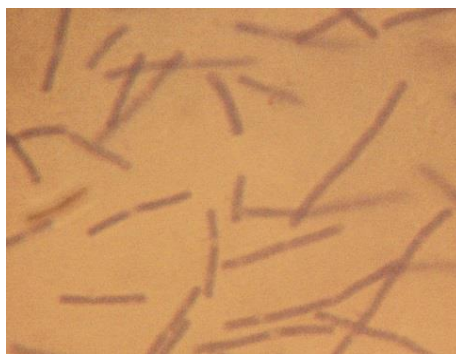


Fig. 2.5. Aspectul microscopic al *Lactobacillus casei* 4791
microscopie fotonică, puterea de mărire 100x. (Autor Cartașev A.).

2.1.5. *Tulpini de bacterii din specia Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* din Colecția Ramurală de Bacterii Lactice (Direcția Tehnologii Alimentare, IȘPHTA).

Caracteristici ale speciei: bacili, imobili, nu formează spori, Gram+, anaerobi sau facultativ anaerobi. În general nu produc catalaza și citocrom-oxidază, nu reduc azotații, nu lichefiază gelatina. Au activitate proteolitică și lipolitică redusă, fermentează lactoza, maltoza, zaharoza (mai ales în faza logaritmică de dezvoltare), glucoza, fructoza și galactoza. Pentru dezvoltare necesită substanțe minerale și toate vitaminele din grupul B. Se dezvoltă bine în mediul cu pH 5,5-5,8, dar și la pH 5,0. Se pot dezvolta în limite largi de temperatură (5-53°C), dar temperatura optimă este cuprinsă între 30 și 45°C.

2.1.6. *Cultura de referință Escherichia coli (ATCC® 25922™)* a fost oferită de către laboratorul specializat al Centrului Național de Sănătate Publică.

Poziția sistematică: Domeniul Bacteria, Regnul Bacteria, Filumul Proteobacteria, Clasa Gama Proteobacteria, Ordinul Enterobacteriales, Familia Enterobacteriaceae, Genul *Escherichia*, Specia *Escherichia coli* (Migula 1895).

Prezintă bacili Gram–negativi din grupa bacteriilor coliforme. Această tulpină se dezvoltă în condiții aerobe, pe mediul tripticază soia (lichid sau geloză), cu temperatura optimă de cultivare 37°C. Tulpina este recomandată în calitate de tulpină de referință pentru determinarea susceptibilității la antibiotice.

2.1.7. *Cultura de referință Staphylococcus aureus (ATCC® 25923™)*, oferită de către laboratorul specializat al Centrului Național de Medicină Preventivă.

Poziția sistematică: Domeniul Bacteria, Regnul Eubacteria, Filumul Firmicutes, Clasa Bacilli, Ordinul Bacillales, Familia Staphylococcaceae, Genul *Staphylococcus*, Specia *Staphylococcus aureus* (Rosenbach 1884).

Prezintă bacterii Gram-pozitive aerobe, de formă sferică, lipsite de capsulă, care la microscop apar sub forma unor aglomerări asemănătoare unui ciorchine. La cultivare pe medii

solide formează colonii mari, sferice, de culoare galben-aurie. Tulpina se cultivă pe mediul tripticază soia (lichid sau geloză), cu temperatura optimă de cultivare 37 °C.

2.2. Mediile nutritive utilizate în studiu

Pentru cultivarea bacteriilor lactice din specia *S. thermophilus* au fost utilizate mediile nutritive după cum urmează:

- *Laptele degresat sterilizat*. Laptele degresat (natural sau restabilit) se sterilizează la 1 atm, ceea ce corespunde temperaturii de (121 ± 2) °C, în eprubete sau vase de sticlă cu volum de 0,1 - 2 l timp de până la 10 min. Un indice indirect de eficacitate a procesului de sterilizare este obținerea culorii crem-deschis a laptelui [156];

- *Lapte hidrolizat*. Laptele degresat se sterilizează la 0,2 MPa timp de 10-15 min. și se răcește până la 45 °C. Laptele astfel obținut trebuie să prezinte o culoare de nuanță crem. Se stabilește pH-ul 7,6 - 7,8 cu ajutorul soluției de NaOH și se adaugă 0,5 - 1 g / l pancreatina; peste câteva minute se adaugă 5 ml de cloroform. Vasul se închide cu un dop și se termostatează timp de 24 ore la temperatura de 40 °C. Primele câteva ore vasul se agită periodic și se deschide pentru eliminarea vaporilor de cloroform. După termostatare se formează un hidrolizat, care se filtrează prin hârtie de filtru. Hidrolizatul obținut se diluează cu apă în proporție de 1:1; 1:2, cu pH 6,8 - 7,0, la care după caz se adaugă alte componente necesare [156];

- *Mediul pentru determinarea fermentării hidraților de carbon*. La 100 ml lapte hidrolizat steril (pH 6,7 - 6,8) se adaugă 1 ml soluție sterilă de indicator Andrade. Hidrații de carbon se adaugă în formă de soluție de 10 %, sterilizată la vapori curenți [156];

- *Laptele turnesolat*. Se obține prin adăugarea la laptele degresat a 5 - 10 % soluție apoasă de turnesol și 10 % soluție de hidrocarbonat de sodiu până la apariția culorii tipice albastru-violet. Se sterilizează la vapori curenți 3 zile la rând câte 20 min. Soluția de turnesol se obține în modul următor: turnesolul se mojarază, se adaugă o cantitate de 10 ori mai mare de alcool de 96% o și se extrage la 37 °C timp de 3 zile, schimbând zilnic alcoolul; sedimentul se usucă în termosta, se adaugă o cantitate de 10 ori mai mare de apă distilată, se menține 3 zile la 37 °C după care se filtrează și se sterilizează la 0,5 atm timp de 30 min [156];

- *Mediu agarizat în bază de lapte hidrolizat*. În lapte hidrolizat se adaugă 1,5 - 1,8% de agar-agar. Se lasă pentru 20 - 30 min să se înmoaie, apoi se topește la 1 atm timp de 15 min. Mediul obținut se distribuie în vasele cu volumul necesar și se sterilizează 10 min la 1 atm (121 ± 2) °C [156].

- *Mediul M 17 pentru izolarea S. thermophilus*

Compoziția mediului: peptonă (1) – 2,5 g; peptonă (2) – 2,5 g; peptonă (3) – 5,0 g; extract de drojdie – 2,5 g; extract de carne – 5,0 g; glicerofosfat – 19,0 g; sulfat de magneziu – 0,25 g;

acid ascorbic – 0,5 g; agar – 9 -18 g; apă distilată - 950 ml. Amestecul și se încălzește până la dizolvarea completă a componentelor, apoi se răcește până la temperatură 50 ± 2 °C, pH-ul $7,2 \pm 0,2$. Mediul preparat se sterilizează la o temperatură de 121 ± 1 °C timp de 15 ± 1 min.

- *Mediul tripticază soia*. Compoziția mediului pentru un litru de apă purificată: extract de cazeină 15,0 g; extract de soia 5,0 g; clorură de sodiu 5,0 g; agar 15,0 g. pH $7,3 \pm 0,2$ se ajustează și/sau completează în funcție de necesități pentru a corespunde criteriilor de performanță.

2.3. Metodele de cercetare

Pentru realizarea lucrării au fost utilizate metode microbiologice, biochimice, fizico-chimice clasice de investigare a bacteriilor lactice. Produsele lactate fermentate obținute au fost caracterizate conform standardelor corespunzătoare. La fel, în scopul identificării tulpinilor noi selectate, au fost utilizate metode ale biologiei moleculare: izolarea, purificarea și cuantificarea ADN-ului; amplificarea fragmentelor ADNr 16S cu utilizarea reacției de polimerizare în lanț (PCR- Polimerase Chain Reaction) urmată de analiza electroforetică a produșilor de amplificare; determinarea variabilității genetice a tulpinilor selectate prin amplificarea secvențelor repetitive ale ADN-ului (tehnica Rep-PCR); spectroscopia în infraroșu cu transformanta Fourier (FT-IR). Pentru optimizarea mediilor de cultură au fost utilizate metode matematice de planificare, iar datele experimentale au fost prelucrate statistic.

2.3.1. Microscopie

Studierea proprietăților morfologice ale bacteriilor lactice selectate a fost realizată prin microscopie fonică, utilizând microscopul binocular Zeiss AxioImager M2 Microscope (Canada); analizele microscopice a fost efectuate cu obiectivul de imersie cu puterea de mărire 100x. S-a estimat mărimea, forma, amplasarea celulelor, absența bacteriilor străine în frotiu.

Vizualizarea coloniilor *S. thermophilus* a fost efectuată cu ajutorul microscopului stereoscopic MBC-6 cu putere de mărire 6x.

Studierea microstructurii iaurtului a fost realizată la microscopul binocular KRUSS, MBL2000, OPTECH (Germania) la obiectivul cu puterea de mărire 40x.

Fotografiile au fost obținute cu ajutorul camerei digitale Power Shot SX170 (CANON, Japonia).

Pentru vizualizarea bacteriilor, au fost pregătite preparate fixe (frotiuri). Frotiurile au fost colorate prin colorația simplă cu albastru de metilen și colorația diferențială – colorația Gram.

Colorația simplă cu albastru de metilen

În calitate de colorant se utilizează soluția de albastru de metilen de 1%. Pe suprafața preparatului uscat se adaugă 1-2 picături de albastru de metilen, se colorează 1-2 minute. Apoi frotiul se spală cu apă distilată până la obținerea culorii albastră-pală, urmată de uscare [156].

Colorația Gram

Frotiul pregătit se usucă la temperatura camerei și apoi se fixează asupra flăcării. Se acoperă frotiul fixat cu soluție apoasă de violet de gențiană și se lasă timp de 2—3 minute. Colorantul se înlătură și frotiul se acoperă cu soluția Lugol pentru 1-2 minute. Mordantul se îndepărtează iar frotiul se spală cu amestec alcool etilic – acetonă până când amestecul de spălare nu se mai colorează. Lama microscopică se spală rapid cu apă distilată și se acoperă cu fucsina timp de 30-60 sec. Se îndepărtează fucsina și se spală frotiul cu apă de robinet, după uscare se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie.

Bacteriile Gram pozitive rezistă la decolorare, rămânând colorate în violet, iar cele Gram negative sunt decolorate de alcool-acetonă și recolorate în roșu-roz [156].

2.3.2. Determinarea numărului de microorganisme aerobe mezofile și facultativ anaerobe

Numărul total de bacterii, drojdii și micromicete într-un 1ml de produs testat a fost determinat prin însămânțarea în profunzime a suspensiei diluate succesiv pe mediu nutritiv solid conform standardului SM EN ISO 4833-1:2014. Pentru aceasta, s-a preparat o serie de diluții succesive în cutii Petri și incubate la temperatura 30 ± 1 °C timp de 48 ore [28].

În culturile pe medii nutritive dense, toate coloniile crescute sunt numărate pentru a estima numărul total de microorganisme viabile într-o probă de produs. Coloniile se numără vizual cu ajutorul unei lentile cu o mărire de șase ori sau un dispozitiv special conceput pentru numărarea coloniilor.

2.3.3. Determinarea numărului de bacterii lactice

Dintr-un 1 ml de coagul format de o tulpină se prepară o serie de diluții zecimale, astfel încât să fie posibilă determinarea numărului de bacterii lactice viabile.

Numărul de bacterii lactice a fost determinat printr-o serie de diluții a câte 1 cm³ în două rânduri paralele de tuburi cu lapte degresat steril, efectuat în conformitate cu metoda indicată în standardul GOST 10444.11 [20].

Pentru calcularea numărului total de bacterii lactice se evaluează ultimele trei diluții în care laptele a fost coagulat. Se compune o caracteristică numerică constituită din trei cifre care indică numărul de eprubete cu lapte coagulat. Prima cifră corespunde diluției în care laptele a fost coagulat în două eprubete succesive. Următoarele cifre indică numărul eprubetei cu lapte coagulat în două diluții paralele.

Conform caracteristicilor numerice se găsește cel mai probabil număr de microorganisme lactice care se înmulțește cu cifra de diluție de la care începe caracteristica numerică [20].

2.3.4. Identificarea bacteriilor coliforme

Dintr-un 1 g de produs se prepară diluția primară printr-o serie de diluții zecimale, încât să fie posibilă determinarea numărului estimat de bacterii coliforme sau cantitatea prevăzută în documentul de reglementare pentru un anumit produs. Fiecare diluție (în triplicat) se introduce în eprubete cu mediu nutritiv pregătit conform standardului GOST 30518 [22]. Eprubetele se termostatează la temperatura de 37 ± 1 °C timp de 24 ± 2 ore. Dacă nu se observă formarea bulelor de gaz sau o turbiditate ce ar împiedica detectarea gazului, incubarea continuă încă 24 ± 2 ore. Eprubetele în care se observă formarea gazului după 24 ± 2 ore sau după 48 ± 2 ore sunt considerate pozitive.

2.3.5. Identificarea drojdiilor și micromicetelor

A fost efectuată conform standardului GOST 10444.12 [21]. 1 g de produs se însămânțează în două cutii Petri pe mediu solid, topit și răcit la 45 ± 1 °C. În paralel, se toarnă 15-20 ml de mediu într-o cutie Petri pentru a verifica sterilitatea acestuia. Cutiile Petri se incubează în condiții aerobe la temperatura de 25 ± 1 °C timp de 5 zile. După 3 zile de incubare se efectuează evaluarea preliminară al numărului de colonii crescute, iar după 5 zile - numărul final. La necesitate, în cazul în care după 5 zile de incubare nu au fost depistate culturi de mucegaiuri și (sau) drojdii, pentru detectarea micromicetelor și drojdiilor de creștere lentă, culturile să lase la temperatura camerei timp de 1-2 zile suplimentar.

2.3.6. Identificarea microorganismelor patogene, inclusiv *Salmonella*

Bacteriile din genul *Salmonella* pot fi prezente în produs în cantități mici, de rând cu un număr mare de alte bacterii din familia *Enterobacteriaceae* sau din alte familii. Prin urmare, este obligatorie îmbogățirea prealabilă a culturii, necesară pentru detectarea unui număr mic de bacterii din genul *Salmonella*. Conform Standardului SM EN ISO 6579, 25 g de produs supus analizei se încălzește până la 37 ± 1 °C și se suspendă în apă peptonată tamponată, urmat de incubare la 37 ± 1 °C timp de 18 ± 2 ore. Culturile incubate se însămânțează pe mediul agarizat și termostatează la 37 ± 1 °C timp de 24 ± 3 ore [29]. Coloniile suspectate a fi din genul *Salmonella* se identifică ulterior prin teste biochimice și serologice specifice.

2.3.7. Identificarea cantitativă a *Staphylococcus aureus*.

Toate mediile pentru identificarea *Staphylococcus aureus* se pregătesc conform metodelor indicate în Standardul SM SR EN ISO 6888-2 [30]. 1 g de produs supus analizei se suspendă în mediul nutritiv selectiv lichid. Eprubetele se incubează la 37 °C timp de 24-48 ore. Prezența estimativă a stafilococilor coagulazo-negativi în mediul lichid se determină conform gradului de turbiditate a mediului. Suprafața mediului selectiv diagnostic agarizat se însămânțează cu

inoculat din eprubetele estimate ca pozitive după 24 de ore și din toate eprubetele după 48 h. Culturile se termostatează la temperatură de 37 °C timp de 24-48 ore.

Prezența prezumtivă a stafilococilor se determină după prezența coloniilor tipice. Confirmarea rezultatelor se efectuează prin studierea colorației Gram, activității catalazei și coagulazei. Confirmarea stafilococilor coagulazo-pozitivi se realizează prin determinarea formării acetonei, fermentării în condiții aerobe a maltozei și, dacă este necesar, determinarea activității nucleazei termostabile și activității hemolitice [30].

2.3.8. Determinarea duratei de coagulare a laptelui

Activitatea fermentativă a tulpinilor de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* a fost estimată pe mediul cu lapte degresat. În eprubetele cu lapte s-a adăugat 3-5% de cultura cercetată și s-a observat durata de coagulare a laptelui [156].

2.3.9. Evaluarea activității de acidifiere

Activitatea de acidifiere a tulpinilor de bacterii *S. thermophilus* a fost evaluată după gradul de micșorare a pH-lui laptelui fermentat de către tulpina respectivă. Bacteriile au fost incubate în lapte degresat steril la temperatura 40 °C timp de 3, 6, și 8 ore. Măsurarea pH-lui s-a efectuat cu ajutorul pH-metrului electronic HANNA (Germania). Aciditatea titrabilă a laptelui a fost determinată în conformitate cu standardul GOST 3624 [19]. Metoda constă în titrarea acizilor și a sărurilor acide din lapte cu o soluție de hidroxid de sodiu, în prezența unui indicator. Aciditatea titrabilă se măsoară în grade Turner (T°). Aciditatea laptelui este cantitatea de soluție de hidroxid de sodiu de 0,1 mol/L (în ml), utilizat la titrarea a 10 ml de lapte, multiplicat x 10. Înainte de analiză se prepară soluții standard de culoare roz: într-un balon de 100 sau 250 ml se adaugă 10 ml de lapte, 20 ml de apă distilată și 1 ml soluție de sulfat de cobalt pentahidrat ($\text{CoSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), obținându-se o soluție de 25 g/L de sulfat de cobalt. Amestecul se agită bine. Soluția standard poate fi păstrată timp de maximum 8 ore la temperatura camerei. Pentru efectuarea analizei se amestecă 10 ml de lapte și 20 ml de apă distilată, se adaugă trei picături de soluție alcoolică de fenolftaleină cu concentrația de 10 g/L. Amestecul se agită bine în decurs de 1 min. și se titrează cu soluție 0,1 mol/L de hidroxid de sodiu până la dispariția culorii roz [19].

2.3.10. Determinarea capacității de fermentare a carbohidraților

Pentru prepararea mediului pentru determinarea fermentării hidraților de carbon, la 100 ml lapte hidrolizat steril (pH 6,7 - 6,8) se adaugă 1 ml soluție sterilă de indicator Andrade. La acest mediu se adaugă câte 1% de carbohidrat (lactoză, ramnoză, zaharoză ș.a.) cu concentrația de 10% (supuse sterilizării la 112 °C și 0,5 atm.), se adaugă tulpina studiată și se cultivă la temperatura optimă timp de 48 ore. Se urmărește schimbarea culorii mediului: culoarea roz intens indică că tulpina a fermentat carbohidratul; culoarea roz pal constată o fermentare slabă, lipsa colorării demonstrează lipsa fermentației [156].

2.3.11. Descompunerea esculinei

Pentru determinarea acestui indice, bacteriile se însămânțează pe plăcile Petri conținând mediul cu următoarea componență : peptonă din cazeină - 0,5%, extract de carne - 0,3%, citrat de fier - 0,05%, esculină - 0,1%, agar - 1,5%, pH - 6,6. Bacteriile se cultivă la 42 °C timp de 12 ore. Hidroliza esculinei este indicată de înnegrirea mediului din jurul coloniilor [69].

2.3.12. Determinarea capacității de sinereză

Proba de lapte fermentat cu masa cunoscută se menține în frigider la 4 °C, după care se colectează zerul eliminat pe suprafața probei și se determină masa probei de lapte fermentat fără zer. Capacitatea de sinereză este exprimată prin greutatea zerului în % față de greutatea inițială a probei de lapte fermentat [49, 106].

2.3.13. Determinarea duratei de coagulare a laptelui inoculat

Laptele integral fiert se inoculează cu 3% de inoculum (după 16 – 18 ore dezvoltare), se termostatează la temperatura optimă până la coagulare. Se urmărește timpul în care s-a format coagulul. Acest indice exprimă la fel și activitatea tulpinii [156].

2.3.14. Determinarea limitei de acidifiere a laptelui

În 10 ml lapte steril degresat se introduce cu ansa cultura cercetată și se termostatează la temperatura optimă timp de 7 zile. După aceasta se determină aciditatea titrantă, ce caracterizează limita de acidifiere a laptelui de către tulpină [23].

2.3.15. Determinarea rezistenței bacteriilor la temperaturi înalte

Rezistența bacteriilor lactice la temperaturile de 60 °C și 65 °C timp de 30 minute se verifică în felul următor: laptele degresat și sterilizat se repartizează în eprubete câte 5 ml și se inoculează tulpina cercetată cu ansa. Se agită pentru omogenizare și se termostatează 4 ore la temperatura de 37°C. În continuare eprubetele se introduc în baia de apă la diferite temperaturi 60°C, 63°C, 65°C, timp de 30 minute, apoi se răcesc. În final probele se termostatează la temperatură optimă încă 24 ore pentru a urmări dacă tulpinile au rezistat la temperaturi. Dacă au rezistat, atunci vor modifica aciditatea mediului sau chiar vor coagula laptele [156].

2.3.16. Determinarea calitativă a activității catalazei

Reacția calitativă de determinare a activității catalazei se bazează pe capacitatea catalazei de a descompune peroxidul de hidrogen în oxigen și apă. Pe lama cu 1-2 picături de peroxid de hidrogen 3% se adaugă o picătură de suspensie a culturii cercetate. Eliminarea bulelor de oxigen indică o activitate pozitivă. [156].

2.3.17 Determinarea eliminării de CO₂

Metoda constă în determinarea ridicării nivelului coagului format în urma încălzirii până la 90 °C a unei probe de lapte inoculat cu cultura cercetată. În cazul când cultura formează dioxid de carbon, coagulul devine spongios și nivelul său deasupra zerului crește de la 0,6 până

la 2-3 cm și mai mult [156].

2.3.18. *Determinarea formării amoniacului din arginină*

Se prepară mediu nutritiv lichid alcătuit din peptonă - 0,05 g/l, K_2HPO_4 - 0,02 g/l, glucoză - 0,005 g/l, l-arginină- 0,03 g/l (pH 6,8 - 7,0). La 2 ml mediu steril se descarcă o ansă de tulpină cercetată și se termostatează la 30°C timp de 48 ore. Prezența amoniacului se determină cu ajutorul reactivului Nessler. Apariția sedimentului de culoare portocalie sau maro indică capacitatea tulpinii de a hidroliza arginina. Dacă cultura cercetată nu formează amoniac, atunci mediul rămâne străveziu [156].

2.3.19. *Determinarea creșterii în mediul cu NaCl*

În mediul de lapte hidrolizat se adaugă NaCl în cantitate de 2%, 4% și 6,5%. Se inoculează cu tulpinile testate (o ansă la 10 ml) și se incubează la temperatura optimă 24 - 48 ore. La sfârșitul perioadei de termostatare se constată prezența sau absența creșterii [156].

2.3.20. *Determinarea rezistenței bacteriilor lactice la mediul alcalin*

Se determină capacitatea de creștere a culturii cercetate în lapte hidrolizat cu pH alcalin stabilit (pH 9,2 pentru streptococii lactici mezofili), cu ajutorul soluțiilor sterile de Na OH (2N) și H_3PO_4 (2N). Culturile se termostatează la temperatura de 30 °C (timp de 48 ore la cercetarea streptococilor lactici mezofili). Creșterea sau lipsa creșterii se determină vizual după prezența sau lipsa turbidității. Se examinează selectiv la microscop [156].

2.3.21. *Determinarea dezvoltării în mediu cu albastru de metilen*

Testul se efectuează în lapte degresat steril cu adaos de 0,1% soluție albastru de metilen înșămânțat cu cultura cercetată, apoi incubat timp de 48 ore la temperatura optimă. Se urmărește coagularea și înălbăstrirea pe verticală (de sus în jos). Se diferențiază lactococii termofili, care nu sunt rezistenți și cei mezofili care se dezvoltă în mediul cu albastru de metilen [156].

2.3.22. *Determinarea creșterii în lapte turnesolat*

Mediul de lapte turnesolat se inoculează cu cultura cercetată, se termostatează la temperatura de 45 °C timp de 24 ore și se urmăresc modificările: reducerea, acidificarea, schimbarea culorii și coagularea laptelui turnesolat. Se diferențiază culturile mezofile și cele termofile. Tulpinile *S. thermophilus* coagulează și reduc laptele turnesolat [78].

2.3.23. *Determinarea producerii de acid lactic*

Se urmărește acumularea de acid lactic după fermentarea laptelui de către culturile studiate. Aciditatea se determină prin titrare cu NaOH 0,1N. (conform 2.3.9). Pentru determinare se ia în considerație faptul ca 1 ml NaOH 0,1N corespunde 0,009 g acid lactic.

2.3.24. *Metoda de determinare a proprietăților antagoniste ale bacteriilor lactice*

Pentru determinarea proprietăților antagoniste ale bacteriilor lactice a fost utilizată metoda godeurilor [136]. În calitate de culturi patogene de referință au fost utilizate

microorganismele: *Staphylococcus aureus* ATCC® 25932™ și *Escherichia coli* ATCC® 25922™. Pentru culturile de referință au fost utilizate mediile nutritive specifice fiecăreia. Pe mediul agarizat distribuit în plăci Petri și populat cu cultura de referință respectivă au fost sfredelitate cu sfredel steril godeuri de diametru 6-8mm, care au fost înlocuite prin culturi de bacterii lactice studiate. Cutiile Petri au fost incubate timp de o zi la temperatura de 37°C. A fost determinat diametrul zonei de inhibiție a creșterii tulpinilor patogene de referință. [156].

Diametrul zonelor de liză a celulelor în jurul godeurilor depinde de gradul sensibilității culturii de referință la antibiotice, conform gradației lui M. Birgher [132]:

- ø zonei până la 10 mm – sensibilitate scăzută;
- ø zonei 11-15 mm – sensibilitatea medie;
- ø zonei 15-25 mm – sensibile;
- ø zonei mai mare de 25 mm – sensibilitate sporită

2.3.25. Izolarea exopolizaharidelor

Coagulul cu volumul de 100 ml se centrifughează (8000 rot/min) timp de 30 min la ROTINA 38R (Hettich®, Germania), supernatantul se decantatează într-un balon separat. La sediment se adaugă 2-4 mL apă distilată, se agită bine, se centrifughează din nou și se decantatează. Operațiunea de spălare a coagulului se repetă de 5 – 7 ori până la reacția negativă a supernatantului la carbohidrați, determinată prin metoda fenol sulfurică (la 1mL de supernatant se adăugă 1mL de soluție apoasă de fenol 5% și 5 mL de acid sulfuric concentrat) . În prezența carbohidraților lichidul din eprubetă devine roșu de diferită intensitate în funcție de cantitatea glucidelor [32]. Supernatantele acumulate se reunesc, proteinele se precipită cu soluție de acid tricloracetic 50%, prin adăugare a 90 mL de acid la 10 mL de supernatant. Proteinele precipitate se separă prin centrifugare la 3000 rot/min timp de 90 min. La supernatant se adăugă un volum dublu de etanol (96%), și se menține la temperatura de 2 - 4 °C timp de 24 ore. Precipitatul obținut, se separă de supernatant prin centrifugare la 3000 rot/min timp de 90 min, se usucă până la o greutate constantă într-un exsicator cu clorură de calciu, timp de 48 ore [65].

2.3.26. Asocierea tulpinilor pentru obținerea culturilor starter pentru iaurt

Într-un pahar conic Erlenmayer cu lapte degresat steril se adaugă câte 0,5% suspensie de fiecare tulpină. Paharele se plasează în incubator la 43±1 °C. Se monitorizează timpul de formare a coagulului. Peste 3 ore de la începutul incubării se verifică rata de creștere a ambelor tipuri de microorganisme prin examinare microscopică. Se selectează combinațiile care au coagulat laptele minimum în 3 ore și pe frotiul microscopic al cărora se observă cel puțin 2-3 bacterii lactice și o dezvoltare abundentă a streptococilor [156]. De regulă, culturile starter pentru iaurt se compun din speciile *S. thermophilus* și *Lb. bulgaricus* având o activitate medie de acidifiere a laptelui timp de 5-7 ore. Culturile starter se prepară după schema prezentată în figura 2.6.

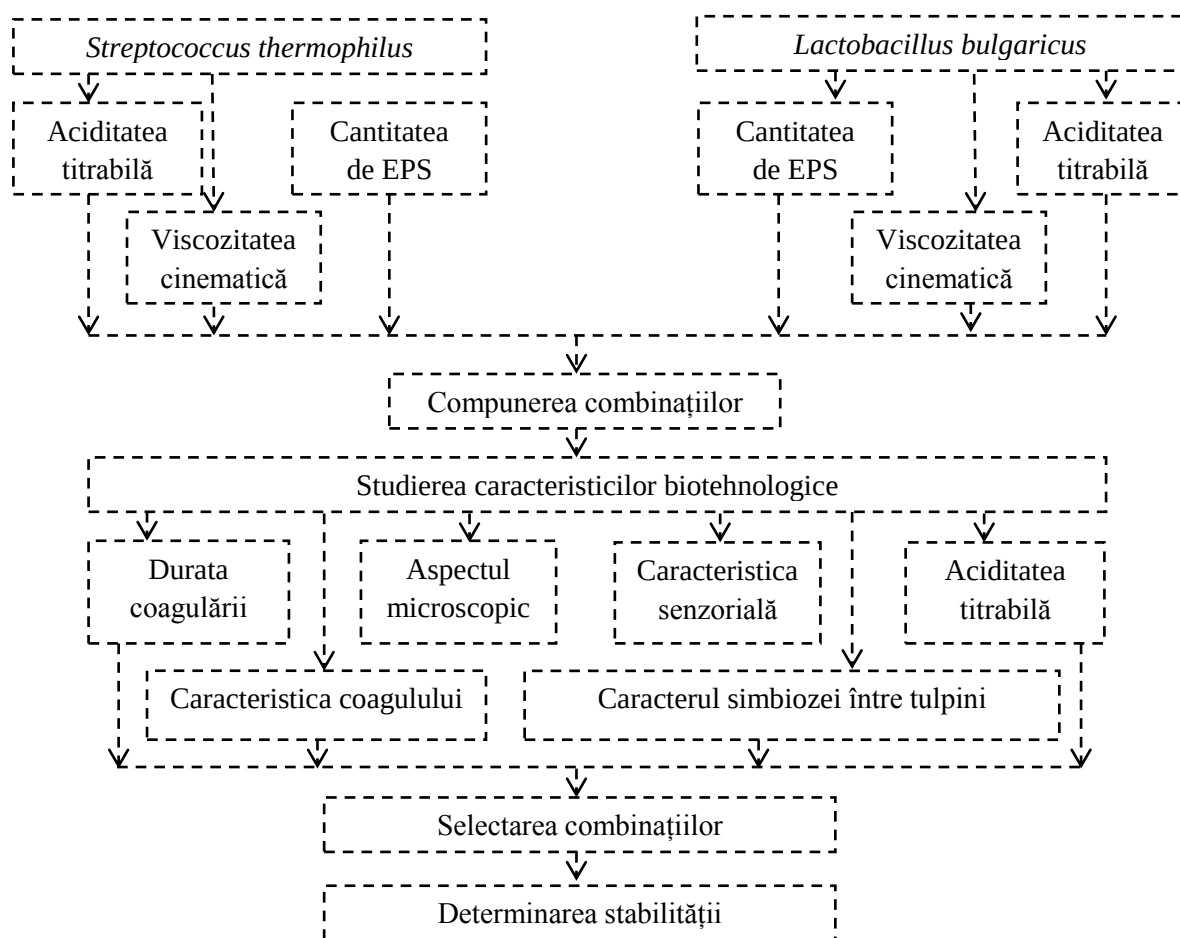


Fig.2.6. Schema de obținere a culturilor starter pentru iaurt.

2.3.27. Determinarea caracteristicilor organoleptice ale culturilor starter

Laptele pasteurizat la temperatura de 43 ± 1 °C se inoculează cu 1-1,5% de cultură. Fermentarea laptelui se efectuează la aceeași temperatură; după formarea coagulului dens laptele fermentat se răcește și se plasează în frigider la 4 ± 2 °C. A doua zi se face degustarea și se selectează culturile care au format coagul dens, cu aromă de lapte curat și gust caracteristic [156].

2.3.28. Determinarea stabilității culturilor starter

Pentru acest test culturile starter se cultiva la temperatura 43 ± 1 °C în lapte degresat steril timp de 15 zile. În eprubete cu lapte degresat steril se introduce 1% de cultură starter. Incubarea se face până la obținerea coagulului, dar nu mai mult de 3 ore. Apoi coagulul se studiază prin microscopie pentru a observa raportul tulpinilor de *S. thermophilus* și *L. bulgaricus*. Prezența a 5-15 bacili în câmpul vizual cu dezvoltare abundentă a streptococilor este cel mai favorabil raport de microorganisme [156].

2.3.29. Determinarea viscozității produsului

Proprietățile reologice ale probelor de iaurt elaborate au fost studiate la reometrul digital BROOKFIELD DV-III, gestionat de un calculator personal cu ajutorul programului Rheocalc 32.

Măsurările se efectuează cu viteza de rotație a axului de până la 200 rot/min la temperatura de 25 °C [144].

2.3.30. *Determinarea conținutului de grăsime prin metoda acido-butirometrică*

Determinarea conținutului de grăsime se efectuează conform SM ISO 11870 [27]. În butiromertul pentru lapte se pun 10 mL acid sulfuric, 5 mL produs lactat acid și 6 mL de apă distilată. Apoi se adaugă 1 mL de alcool izoamilic. Se astupă butirometrul cu un dop de cauciuc prin înșurubare și se omogenizează. După omogenizare, se centrifughează timp de 5 minute la 1000-1200 rot /min, apoi se pune la baie de apă cu temperatura de 65° C. Pe tija butirometrului se citește conținutul de grăsime, iar valoarea indicată se înmulțește cu 2,2.

2.3.31. *Determinarea microstructurii iaurturilor*

Mostrele de iaurt congelate la temperatura de minus 18°C au fost uscate la temperatura camerei și colorate timp de 10 min cu Erlich-hematoxilină, apoi cu o soluție apoasă de eozină. Studiarea microscopică a fost efectuată la microscopul optic binocular (OPTECH, Biostar B3, Germany) [167]. Fotografiile au fost obținute cu ajutorul camerei digitale PowerShot SX170 (CANON, Japonia).

2.3.32. *Determinarea conținutului apei în concentratele bacteriene.*

Conținutul apei în concentratele bacteriene liofilizate se efectuează conform GOST 3626 [20]. Într-o fiola se introduc 10–15 g nisip, se usucă timp de 30 min în etuva la temperatura de 103±2° C. Apoi fiola se închide cu capac, se scoate din etuvă și se răcește într-un desicator la temperatura camerei. După răcire fiola se cântărește cu o eroare de ± 0,001 , apoi se adaugă 10 g de probă cântărită cu o eroare de ± 0,001 g, se amestecă bine cu nisipul din fiolă și se plasează în etuva de uscare la o temperatură de 103 °C. Uscarea se efectuează timp de 4±0,1 ore de la momentul în care temperatura din etuvă atinge 103 °C. După 4 ore fiola se închide cu capac, se scoate din etuvă și se răcește la temperatura camerei într-un desicator. Apoi, se cântărește cu o eroare de ± 0,001 g. Dacă modificarea masei este mai mare de 0,1% din masa inițială a probei, atunci uscarea se repetă până când masa nu va deveni constantă.

Conținutul de apă se calculează după formula:

$$Apă(\%) = \frac{G_1 - G_2}{G_1 - G} \cdot 100, \quad (2.1)$$

unde: G – masa fiolei cu nisip, (g);

G_1 – masa fiolei cu nisip și proba înainte de uscare (g);

G_2 – masa fiolei cu nisip și proba după uscare (g);

100 – factor de conversie în procente.

2.3.33. Izolarea și purificarea ADN-ului

O colonie de cultură pură a unei tulpini bacteriene, după cultivarea pe mediu solid (M17 geloză) se inoculează în 5 mL de mediu lichid (M17 bulion) și se incubează timp de 24 de ore la 37°C. Separarea celulelor bacteriene se realizează prin centrifugarea 1 ml de suspensie bacteriană timp de 10 minute la 5000 rot/min. Se îndepărtează supernatantul, sedimentul se spală cu 500 ml de apă distilată sterilă și se centrifughează din nou (5000 rot/min). Pentru a izola ADN-ul din celule se utilizează kit-ul Blood & Tissue Kit DNeasy (Qiagen). Izolarea ADN-lui se efectuează conform DNeasy® Blood & Tissue Handbook în mai multe etape: liza celulară cu detergenți, sedimentarea proteinelor și deproteinizarea cu soluții saline concentrate și solvenți organici, sedimentarea ADN-ului cu alcool etilic absolut rece și recuperarea sa prin centrifugare. Ulterior are loc purificarea ADN-ului prin deproteinizare repetată și tratare cu ARN-ază [63].

2.3.34. Determinarea concentrației de ADN izolat

Având în vedere faptul că în marea majoritate a cazurilor valoarea concentrației de ADN este importantă pentru manipulările ulterioare ale acestuia, este absolut necesar ca înainte de determinarea concentrației să se estimeze gradul de puritate a extractului, și respectiv, determinarea exactă a concentrației [33].

Concentrația ADN-lui izolat și purificat a fost determinată prin fluorimetrie. Inițial, a fost construită curba de calibrare, cu utilizarea a 8 concentrații de ADN Labda (ADN standard al fagului labda al *E.coli*). Pentru colorare a fost utilizat Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Pentru măsurarea intensității fluorescenței (excitație la 420 nm, emisie la 520 nm) a fost utilizat dispozitivul Safire² (Tecan, Grödig bei Salzburg, Austria). Rezultatele măsurărilor au fost prelucrate cu ajutorul soft-ului Magellan (Tecan).

2.3.34. Amplificarea fragmentelor ADN_r 16S cu utilizarea reacției de polimerizare în lanț (PCR- Polimerase Chaine Reaction)

Reacția PCR este o metodă de amplificare exponențială enzimatică *in vitro* a unui fragment de ADN, constituită din cicluri succesive de replicare a secvenței nucleotidice, utilizând doi primeri ce flanchează regiunea țintă și hibridizează cu cele două catene ADN, care conțin regiunea ce va fi amplificată. Reacția constă dintr-o succesiune de etape, ce necesită diferite temperaturi de lucru: denaturarea ADN, legarea primerilor și amplificarea ADN.

Pentru amplificarea genelor ce codifică pentru ARNr 16S au fost utilizați primerii universali 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) și 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT) și aplicată tehnica de amplificare PCR Veriti 96 (Applied Biosystems, Foster City, California, SUA) conform protocolului experimental. Componenta amestecului de reacție (MasterMix) este prezentată în Tabelul 2.1

Tabelul 2.1. Componentele și volumul utilizat la realizarea reacției PCR

Componentele	Volumul (μl)
Primer sens 27f	0,3
Primer antisens 1492r	0,3
Tampon PCR	2,5
MgCl ₂	2,5
dNTP 200uM	0,5
Taq ADN Polimerază Cheetah®	0,3
H ₂ O deionizată	15,6

Tabelul 2.2. Etapele reacției PCR

Temperatură și durată 35 de cicluri					
Etapa inițială 1 ciclu	Denaturare	Hibridizare	Extindere	Extensie finală	Etapa finală
95°C – 2 min	94°C – 1 min	54°C – 1 min	72°C – 2 min	72°C – 10 min	∞ 4°C

După finalizarea reacției PCR se efectuează electroforeza în gel de agaroză pentru vizualizarea produselor de amplificare.

2.3.35. Electroforeza în gel de agaroză

Electroforeza este o metodă fizico-chimică ce se bazează pe fenomenul migrării unor particule încărcate electric într-un mediu solid sub acțiunea unui câmp electric extern. Principiul general al electroforezei acizilor nucleici constă în faptul că la pH neutru sau alcalin acizii nucleici au sarcină totală negativă și vor migra spre electrodul pozitiv. Moleculele migrează în gel cu viteze diferite, în funcție de dimensiuni.

Conform protocolului experimental, se realizează următoarele etape:

1) Prepararea gelului de agaroză de concentrația 1% (0,4 g de agaroză în 40 ml tampon TAE 1X), topirea prin încălzire și colorarea cu 4 μl de colorant GelRed pentru a permite vizualizarea ulterioară a ADN, turnarea gelului cald (50°C) în tăvița tancului de electroforeză, care se lasă timp de 30-40 min la temperatura camerei pentru solidificare.

2) Pregătirea probelor de ADN care se amestecă cu tamponul și se încarcă cu mare atenție în godeuri cu o pipetă automată.

3) Pornirea electroforezei prin conectarea la sursa de curent fixată la o tensiune constantă 400 V. Durata migrării este de 60-90 min.

4) Vizualizarea moleculelor ADN din gel cu ajutorul unui transiluminator UV(UVP, Upland, California, USA). În calitate de sursă de alimentare se folosește PowerPac Basic (BIO RAD, Hercules, California, USA) [63].

2.3.36. Identificarea tulpinilor bacteriene prin tehnica Rep-PCR

Rep-PCR este o metodă de bază în biologia moleculară potrivită pentru identificarea și clasificarea rapidă a microorganismelor. Această tehnică permite amplificarea secvențelor repetitive ale ADN-ului organismelor procariote, folosindu-le drept situsuri pentru primerii oligonucleotidici. Producții de amplificare se separă prin electroforeză, fiecare specie sau chiar tulpină prezentând un profil diferit. Primerul GTG₅ (5 'GTG GTG GTG GTG GTG 3') este foarte potrivit pentru tipizarea bacteriilor lactice, metoda Rep-PCR având o facultate discriminatorie mai mare în diferențierea tulpinilor apropiate.

Pentru tipizarea a 5 tulpini *S. thermophilus* și 1 tulpină de referință a fost aplicată reacția de amplificare cu utilizarea primer-ului GTG₅, și programul PCR ce include: denaturarea inițială (7 min la 95°C), amplificare (40 cicluri, 1 min la 94°C, 1 min la 53°C, 8 min la 65°C), elongare finală (16 min la 65°C). Producții de amplificare au fost separați prin electroforeză în gel de poliacrilamidă și evidențiați în lumină UV după o colorare prealabilă cu un colorant specific. [33].

2.3.37. Spectroscopia în infraroșu cu transformantă Fourier (FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Identificarea microorganismelor prin această metodă se bazează pe compoziția chimică a materialului celular. Spectroscopia FTIR are la bază o sursă de lumină cu radiație infraroșie, care trecând prin proba studiată, provoacă mișcări sub formă de vibrații, datorită faptului că legăturile chimice din interiorul moleculelor absorb energie de la fotoni. Vibrațiile oferă informații despre structura chimică a probei și apar sub forma unui spectru.

Toate spectrele tulpinilor de *S. thermophilus* au fost analizate folosind software-ul OPUS pe intervale de frecvență spectrale totale (4000-500 cm⁻¹) sau pe ferestre spectrale unice: W1 (3100-2800 cm⁻¹) – regiunea acizilor grași; W2 (1800-1500 cm⁻¹) – regiunea amidică; W3 (1500-1200cm⁻¹) – regiunea mixtă care conține informații despre proteine, acizi grași și fosfați; W4 (1200-900 cm⁻¹) – regiunea polizaharidică; W5 (900-700 cm⁻¹) – adevărata amprentă digitală – cu vizualizarea câtorva modele spectrale specifice, care încă nu sunt atribuite componentelor celulare sau grupurilor funcționale.

Bacteriile lactice se cultivă în mediul M17 (Merck) timp de 16 ore la 37 °C cu agitare lentă de 2 Hz. După efectuarea diluțiilor zecimale în 0,9% NaCl, un volum de 0,2 ml de suspensie din diluțiile 10-3, 10-4 și 10-5, se însămânțează prin epuizarea ansei pe mediul agarizat M17. Culturile se termostatează timp de 72 ore la 37 °C. Din plăcile Petri, 2-3 colonii separate sunt

preluate cu ansa și suspendate în 100 μ l de apă distilată. Suspensia ce conține celule întregi se agită timp de 1 min, apoi 35 μ l de suspensie se transferă în celulele speciale de pe placa de măsurare spectroscopică. Placa cu probe se usucă la 37 $^{\circ}$ C timp de 45 de minute și imediat sunt supuse măsurării spectroscopice prin metoda de transmisie la o lungime de undă de 4000 cm^{-1} și 500 cm^{-1} , folosindu-se un spectrofotometru FTIR echipat cu modulul HTS-XT (Bruker Optics, Ettlingen, Germany). Fiecare probă se scanează de 32 de ori, la o rezoluție de 4 cm^{-1} și o viteză de scanare de 0,5 cm/s . Spectrele sunt prelucrate prin software-ul OPUS (Bruker), prin calcularea primului derivat al algoritmului Savitzky - Golay cu 9 puncte de atenuare și vectorul-normalizare în regiunea 1780-720 cm^{-1} [87]

2.3.38. Procesul de liofilizare a bacteriilor lactice

Pentru păstrarea culturilor de bacterii lactice selectate a fost utilizată stația pilot a laboratorului de Biotehnologii alimentare a IȘPHTA formată din: bioreactorul Biostat Sartorius A+, centrifuga cu răcire Rotina 38R și liofilizatorul LABCONCO Freeze Dry System (Figura 2.7).

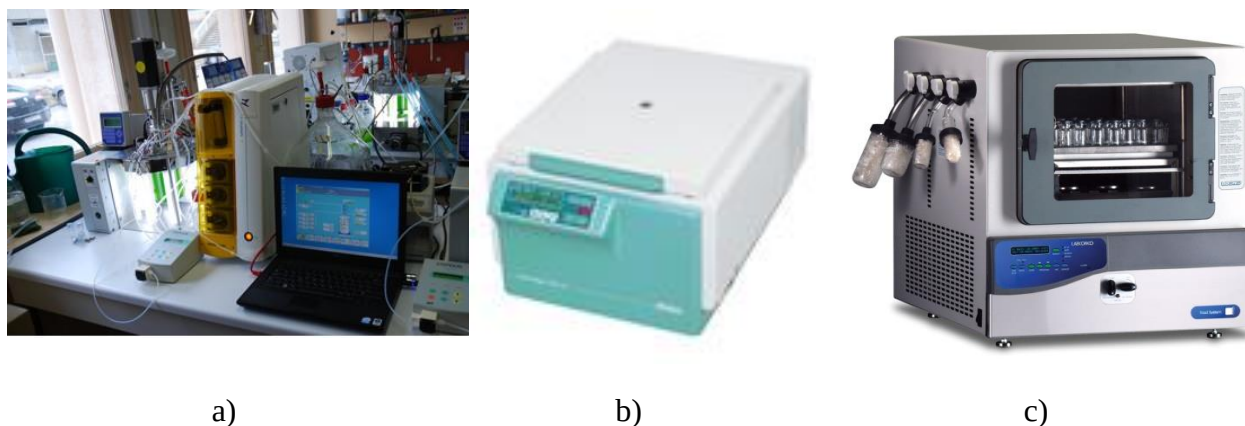


Fig. 2.7. Aparatajul utilizat pentru cultivarea, concentrarea și liofilizarea bacteriilor lactice:

- a) Bioreactorul Biostat Sartorius A plus; b) Centrifuga cu răcire Rotina 38R;
c) Liofilizatorul LABCONCO.

Liofilizarea este un procedeu de conservare prin uscare care constă în eliminarea apei dintr-un produs congelat în prealabil prin sublimarea sub vid (adică trecerea directă a apei din stare solidă în stare de vapori) și printr-un aport dirijat de căldură [127]. Procesul de liofilizare se efectuează prin congelarea și uscarea suspensiei în vid 57 Pa direct din stare congelată, evitând faza lichidă. În aceste condiții bacteriile se păstrează în stare de anabioză cu metabolism limitat.

Liofilizarea a fost efectuată în instalația de marca Labconco, conform procedurii elaborat în Laboratorul de biotehnologii alimentare IȘPHTA [52]. Biomasa bacteriană a fost separată de lichidul cultural prin centrifugare la 11000 rot/min, timp de 30 ± 2 min. Sedimentul a fost resuspendat în mediul protector în raport de 1:1 și repartizat a câte 4 ml în flacoane sterile cu capacitatea de 10 ml pentru liofilizarea ulterioară. Flacoanele cu suspensie au fost congelate la

temperatura de -40°C. Treptat temperatura s-a ridicat până la +27 °C, pentru eliminarea maximală a umidității. Durata procesului de liofilizare - 20±2 ore.

2.3.39. Analiza de regresie

Analiza de regresie constă în determinarea relației expresiei analitice (ecuația de regresie), în care schimbarea caracteristicilor efective (ex. aciditatea titrabilă și activă, numărul de bacterii viabile) se datorează influenței unui factor (ex. durata de cultivare a tulpinii). Ea se realizează cu scopul de a găsi modelul de regresie, care exprimă rezultatele experimentelor maximal corect (modelul de regresie rațional).

- Construirea intervalului de încredere

Construirea intervalului de încredere a fost efectuată conform cerințelor stabilite în Standardul GOST 8.207 „Sistem de stat pentru asigurarea uniformității măsurătorilor. Măsurători directe cu observații multiple. Metode de prelucrare a rezultatelor observațiilor. Principii de bază” și GOST R 50.1.037 „Recomandări pentru standardizare. Statistici aplicate. Reguli de verificare a coînciderii distribuției experimentale cu cea teoretică” [18,153].

Utilizând MO Excel a fost construite intervalele de încredere pentru parametrii medii ai indicilor de aciditate activă a laptelui în timpul dezvoltării tulpinii (Tab.2.3 și 2.4).

- Determinarea punctelor staționare după modelul optimal

Pentru determinarea punctului în care maximumul absolut al funcției poate fi așteptat în regiunea cercetată au fost construite curbele ce descriu cinetica dezvoltării tulpinilor studiate la începutului fazei logaritmice prin modelul polinomial de ordinul 3 (temperatura de cultivare 32 °C și 40 °C) (fig. 2,8 și 2.9).

Tabelul 2.3. Calculul intervalelor de încredere

Timp, ore	<i>Streptococcus thermophilus</i> CNMN-LB-50					
	Aciditatea titrabila, °T					
	x1	x2	x3	xmed	x1-xmed	x2-xmed
0	6,5	6,5	6,6	6,533333	-0,03333	-0,03333
3	6,45	6,4	6,5	6,45	0	-0,05
5	6,3	6,3	6,4	6,333333	-0,03333	-0,03333
7	6,1	6,2	6,2	6,166667	-0,06667	0,033333
9	5,9	5,8	5,9	5,866667	0,033333	-0,06667
10	5,6	5,65	5,6	5,616667	-0,01667	0,033333
11	5	5,1	5,15	5,083333	-0,08333	0,016667
12	4,7	4,8	4,7	4,733333	-0,03333	0,066667
13	4,6	4,7	4,6	4,633333	-0,03333	0,066667
14	4,5	4,5	4,6	4,533333	-0,03333	-0,03333

Tabelul 2.4. Calculul intervalelor de încredere

$(x1-xmed)^2$	$(x2-xmed)^2$	$(x3-xmed)^2$	$\Sigma(xi-xmed)^2$	Variation	Confidence	Conf 1	Conf 2
0,0011111111	0,001111111	0,004444444	0,006666667	0,002222	0,002514635	6,530819	6,535848
0	0,0025	0,0025	0,005	0,001667	0,001885976	6,448114	6,451886
0,0011111111	0,001111111	0,004444444	0,006666667	0,002222	0,002514635	6,330819	6,335848
0,0044444444	0,001111111	0,001111111	0,006666667	0,002222	0,002514635	6,164152	6,169181
0,0011111111	0,004444444	0,001111111	0,006666667	0,002222	0,002514635	5,864152	5,869181
0,0002777778	0,001111111	0,000277778	0,001666667	0,000556	0,000628659	5,616038	5,617295
0,0069444444	0,000277778	0,004444444	0,011666667	0,003889	0,004400611	5,078933	5,087734
0,0011111111	0,004444444	0,001111111	0,006666667	0,002222	0,002514635	4,730819	4,735848
0,0011111111	0,004444444	0,001111111	0,006666667	0,002222	0,002514635	4,630819	4,635848
0,0011111111	0,001111111	0,004444444	0,006666667	0,002222	0,002514635	4,530819	4,535848

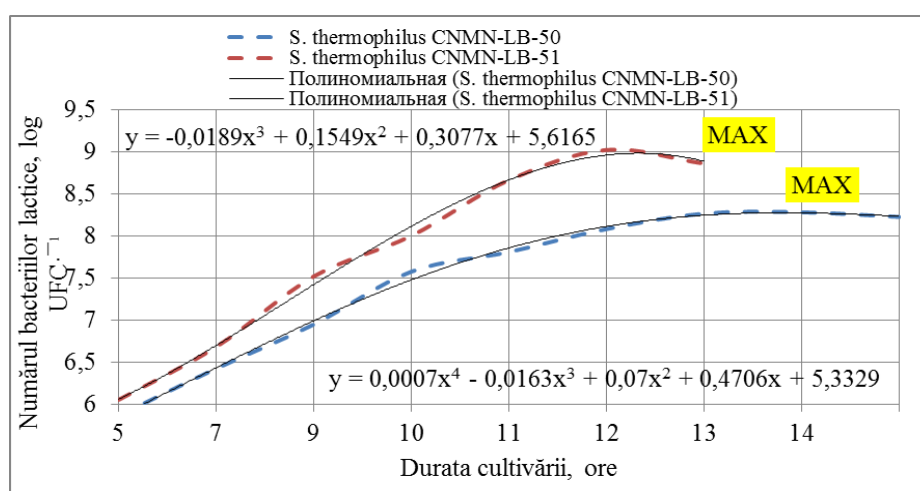


Fig. 2.8. Cinetica dezvoltării tulpinilor producătoare de EPS la 32°C.

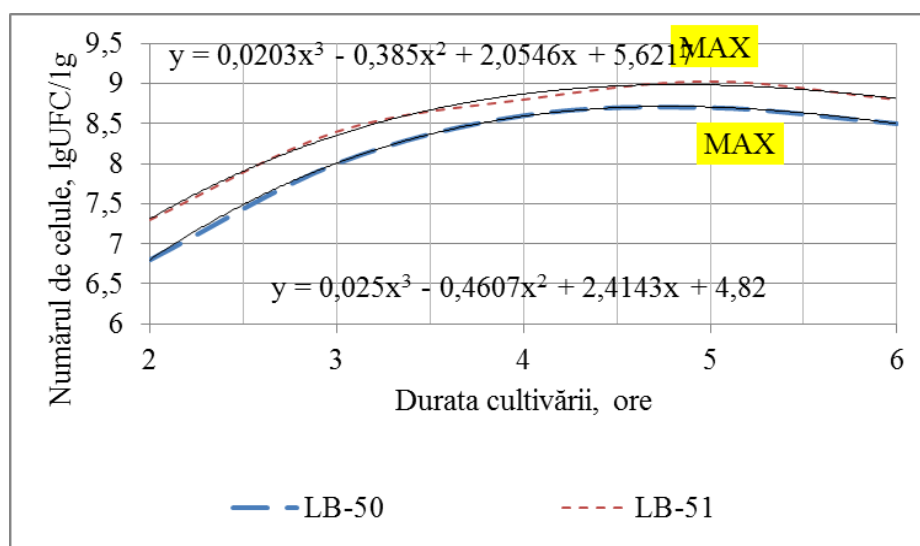


Fig. 2.9. Cinetica dezvoltării tulpinilor producătoare de EPS la 40°C.

În toate punctele analizate proximitatea modelului matematic de cel experimental (adică, $R^2=1$ sau 0,99) se obține prin aproximarea datelor experimentale, utilizându-se ecuația polinomială de ordinul al treilea. Având în vedere că scopul urmărit al identificării structurale

constă în obținerea modelului optimal de ordinul cel mai mic, presupunem că modelul optimal ar fi x^3 . De aceea, modelul polinom de ordinul trei cel mai adecvat descrie rezultatele experimentelor.

A fost important însă de a se găsi punctul de trecere, folosind metodele de analiză matematică după modelul optimal. Prin construirea dependențelor experimentale (numărul de celule în timpul cultivării) au fost găsite punctele, în care poate fi așteptat max. absolut al funcției în zonă cercetată. Extremele obținute după modelele matematice sunt relativ apropiate, și coincid aproximativ cu extremele obținute în cadrul experimentului, ceea ce confirmă faptul că experimentul a fost efectuat cu exactitate acceptabilă.

Evaluarea comparativă ale extremelor modelelor dependenței de ordinul al treilea (2^3) este prezentată în Tabelul 2.5.

Tabelul 2.5. Tabelul rezumativ ai extremelor pentru estimarea numărului de bacterii lactice (y).

Ecuatiile de regresie	Extremele obținute în rezultatul experienței		Extremele conform modelului matematic	
	x	y	x	y
Cultivare la temperatură 32°C				
$y = -0,0189x^3 + 0,1549x^2 + 0,3077x + 5,6165$	12	9,02	12,35	8,977
$y = -0,0014x^3 - 0,0299x^2 + 0,7217x + 5,1495$	14	8,28	12,276	8,148
Cultivare la temperatură 40°C				
$y = 0,0203x^3 - 0,385x^2 + 2,0546x + 5,6217$	5	9,0	4,67	8,984
$y = 0,025x^3 - 0,4607x^2 + 2,4143x + 4,82$	5	8,7	5	8,714

- Analiza de regresie liniară

În rezultatul prelucrării matematice a datelor experimentale a fost obținute ecuațiile de regresie de ordinul al treilea, care descriu adecvat dependența acidității active (y) de durata cultivării (x).

Pentru determinarea modelului optimal din datele experimentale se efectuează identificarea structurală și anume aproximația datelor prin ecuații polinomiale de diferite ordine, în scopul determinării ecuațiilor optime de ordin minimal, cu calculul coeficientului de determinare (sau de corelație R^2), care demonstrează cât de exact este modelul de regresie obținut, cu alte cuvinte gradul de proximitate al dependenței experimentale și modelul său matematic. Va fi considerată optimală ecuația și, prin urmare, modelul de ordinul corespunzător, coeficientul de determinare al căreia va fi egal sau apropiat de 1. Rezultatele sunt prezentate în Tab. 2.6 și 2.7.

Tabelul 2.6. Identificarea structurală a curbelor experimentale a parametrilor estimați în timpul dezvoltării tulpinii la temperatură de 32 ± 1 °C

Gradul de aproximare	Ecuațiile de regresie	Coeficientul de determinare (R^2)
	Aciditatea	
1	$y = -0,2632x + 6,9933$	$R^2 = 0,9445$
2	$y = -0,001x^2 - 0,2519x + 6,9708$	$R^2 = 0,9446$
3	$0,0089x^3 - 0,1484x^2 + 0,4279x + 6,2043$	$R^2 = 0,9853$
	Numărul de bacterii viabile	
1	$y = 0,3624x + 4,8898$	$R^2 = 0,9161$
2	$y = -0,0351x^2 + 0,7841x + 3,9762$	$R^2 = 0,9833$
3	$y = -0,0051x^3 + 0,0568x^2 + 0,3234x + 4,5338$	$R^2 = 0,9935$
4	$y = 0,0012x^4 - 0,0343x^3 + 0,2894x^2 - 0,3633x + 5,1037$	$R^2 = 0,9974$
	Cantitate de EPS	
1	$y = 7,6986x + 2,3178$	$R^2 = 0,8378$
2	$y = -0,1525x^2 + 9,3764x - 1,0378$	$R^2 = 0,8399$
3	$y = -0,0667x^3 + 0,9485x^2 + 4,2981x + 4,6878$	$R^2 = 0,8423$
4	$y = -0,2183x^4 + 4,7363x^3 - 34,201x^2 + 100,36x - 70,239$	$R^2 = 0,9768$

Tabelul 2.7. Identificarea structurală a curbelor experimentale a parametrilor estimați în timpul dezvoltării tulpinii la temperatură de 40 ± 1 °C

Gradul de aproximare	Ecuațiile de regresie	Coeficientul de determinare (R^2)
	Aciditatea activă	
1	$y = -0,3238x + 6,7667$	$R^2 = 0,9819$
2	$y = 0,0167x^2 - 0,4571x + 6,9667$	$R^2 = 0,9898$
3	$y = 4E-15x^3 + 0,0167x^2 - 0,4571x + 6,9667$	$R^2 = 0,9898$
4	$y = -0,0018x^4 + 0,0283x^3 - 0,1361x^2 - 0,14x + 6,7667$	$R^2 = 0,9902$
	Numărul de celule viabile	
1	$y = 0,4982x + 5,5714$	$R^2 = 0,8794$
2	$y = -0,0649x^2 + 1,0173x + 4,7929$	$R^2 = 0,9241$
3	$y = -0,0486x^3 + 0,5185x^2 - 0,9758x + 6,5429$	$R^2 = 0,9887$
4	$y = 0,0078x^4 - 0,1729x^3 + 1,1896x^2 - 2,3691x + 7,4214$	$R^2 = 0,9921$
	Cantitate de EPS	
1	$y = 8,85x + 2,4714$	$R^2 = 0,6357$
2	$y = -3,4x^2 + 36,05x - 38,329$	$R^2 = 0,9172$
3	$y = -0,9972x^3 + 8,5667x^2 - 4,8361x - 2,4286$	$R^2 = 0,9795$
4	$y = 0,1511x^4 - 3,4154x^3 + 21,629x^2 - 31,954x + 14,671$	$R^2 = 0,9825$

2.3.40. Planificarea matematică a experiențelor de optimizare a mediului de protecție

Optimizarea mediului de protecție pentru liofilizarea bacteriilor lactice a fost realizată prin elaborarea modelelor matematice adecvate privind calculul indicelui de viabilitate a tulpinilor liofilizate, luând în considerație toate interacțiunile posibile între agenții de protecție utilizați.

Planificarea matematică a experimentelor presupune elaborarea unei scheme experimentale, compuse din date structurate, în care sunt reflectate toate combinațiile posibile între factorii de influență. Aceste date definesc matricea experiențelor sau matricea-sistem al experimentului planificat [12].

În practica experimentelor planificate, factorilor de influență li se atribuie câte două nivele de variație: un nivel superior x_{sup} și un nivel inferior, x_{inf} . Aceste două nivele sunt alese la distanța egală față de nivelul central x_0 al factorului de influență, numit și nivel de bază sau punctul zero, care indică valoarea factorilor de influență în jurul cărora trebuie să se realizeze modelarea experimentală. Intervalul limitat de valorile inferioare și superioare ale factorilor de influență definește domeniul experimental. Toți factorii de influență pot lua valori în acest interval de variație considerat. Pentru simplificarea modului de prezentare și în vederea generalizării matricelor-sistem ale experimentelor factoriale, se aplică o transformare de coordonate prin adoptarea următoarei convenții: se atașează nivelului superior al factorului de influență simbolul "+1", nivelului inferior simbolul "-1", iar punctului central (în cazul realizării experimentului în trei nivele de investigație), respectiv simbolul "0" [12].

Matricea inițială (în forma codificată) de stabilire a legăturii matematice între funcția de răspuns Y și factorii cercetați X este prezentată de formula următoare:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i \neq j}^k b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \dots, \quad (2.3)$$

unde:

Y – funcția de răspuns;

$x_{i,j}$ – valoarea codificată a factorului i, j ;

b_0, b_i, b_{ij} – coeficienții ecuației.

k – nivel superior al variabilei naturale;

Trecerea de la variabilele reale la cele codate este realizată prin efectuarea unei schimbări de variabilă care se obține prin schimbarea unității de măsură și o schimbare a originii sistemului de axe de coordonate. Coeficienții b_i se determină pe baza datelor experimentale obținute în cadrul experiențelor planificate, efectuate într-o ordine aleatoare (randomizată). Stabilirea ordinii de efectuare a experiențelor se alege cu ajutorul tabelului datelor cu distribuție probabilistică.

Tabelul structurat al nivelurilor factorilor determină matricea sistemului, conținând diferite valori pentru factorii x_i .

Matricea sistem al experiențelor de optimizare a mediului de protecție pentru bacterii lactice este prezentată în tabelul 2.8.

Tabelul 2.8. Matricea-sistem a experiențelor pentru optimizarea mediului protector

Nr. crt.	Forma codificată				Cantitatea în mediul protector, % (restul lapte degresat)				Y%
	x1	x2	x3	x4	x1	x2	x3	x4	
					glicerol	zaharoză	citrat de sodiu	gelatină	
1	+1	+1	+1	+1	30	15	10	10	84*
2	-1	-1	+1	+1	10	5	10	10	61
3	+1	-1	-1	-1	30	5	5	2	57
4	-1	+1	-1	+1	10	15	5	10	90
5	+1	-1	-1	+1	30	5	5	10	62
6	+1	+1	+1	-1	30	15	10	2	72
7	-1	-1	+1	-1	10	5	10	2	58
8	-1	+1	+1	+1	10	15	10	10	70
9	+1	-1	+1	+1	30	5	10	10	61
10	+1	+1	-1	-1	30	15	5	2	62
11	-1	-1	-1	-1	10	5	5	2	59
12	-1	+1	+1	-1	10	15	10	2	87
13	+1	-1	+1	-1	30	5	10	2	52
14	+1	+1	-1	+1	30	15	5	10	71
15	-1	-1	-1	+1	10	5	5	10	60
16	+1	0	0	0	30	10	7,5	5	73
17	-1	0	0	0	10	10	7,5	5	75
18	0	+1	0	0	20	15	7,5	5	95
19	0	-1	0	0	20	5	7,5	5	62
20	0	0	+1	0	20	10	10	5	97
21	0	0	-1	0	20	10	5	5	87
22	0	0	0	+1	20	10	7,5	10	85
23	0	0	0	-1	20	10	7,5	2	88
24	0	0	0	0	20	10	7,5	5	89

Nota: *conform analizei ANOVA media rezultatelor variabilei dependente ($n=3$) este statistic veridică la nivelul de semnificație global 0,05 cu un nivel de încredere de 95%.

Conform acestei matrice a fost montată experiența plurifactorială, în baza rezultatelor căreia a fost obținută ecuația de regresie, care descrie veridic ($p<0,05$) modificarea viabilității bacteriilor lactice în funcție de conținutul substanțelor de protecție în mediul de liofilizare.

2.3.41. Analiza statistică a datelor

a. Prelucrarea statistică a datelor privind rezultatele a 3-5 repetări obținute s-a efectuat prin calcularea următorilor parametri [135]:

- Selectarea datelor și calculul mediei:

$$M = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad (2.4)$$

unde:

x_i – valoarea individuală a măsurării; n – numărul variantelor caracteristicii statistice.

- Calculul variației eșantionului și deviația standard a unui eșantion:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - M)^2}{n-1}, \quad (2.5)$$

$$S = \sqrt{S^2}, \quad (2.6)$$

- Calcularea intervalului de încredere pentru o medie:

$$\left(M - t_{\alpha, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}; M + t_{\alpha, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}} \right), \quad (2.7)$$

unde: $t_{\alpha, n-1}$ – Student's, t-distribuție;

b. Analiza secvențelor obținute în urma tehnicilor de PCR a fost efectuată cu ajutorul softului GelCompar 6.6.11.

c. Prelucrarea matematică a datelor experimentale conform matricelor experimentelor planificate de tip 2^2 , 2^3 și 2^4 a fost efectuată cu ajutorul programului *MO Excel*, interpretarea grafică a rezultatelor a fost efectuată cu ajutorul *MO Excel* și *SigmaPlot 11.0*.

2.4. Concluzii la capitoul 2

1. În calitate de obiecte de studiu în această lucrare au fost utilizate tulpini autohtone de *S. thermophilus* izolate din lapte crud și din produsele lactate de fermentare spontană și culturi tip de referință din diverse colecții de microorganisme, care au permis evidențierea proprietăților specifice și identificarea la nivel genetic a tulpinilor selectate. Utilizarea tulpinilor autohtone de bacterii lactice în cercetările moleculare în comparație cu tulpinile de referință din alte colecții oferă rezultatelor și o valoare teoretică pronunțată în aspect geografic zonal.
2. Metodele clasice și moderne, echipamentele și mediile nutritive utilizate în studiu asigură atât identificarea fenotipică și genotipică a tulpinilor noi autohtone de *S. thermophilus*, cât și descrierea proprietăților tehnologice ale culturilor starter și produselor lactate fermentate obținute prin utilizarea lor.

3. SELECTAREA TULPINILOR AUTOHTONE NOI DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

Fabricarea produselor lactate fermentate prezintă un proces biotehnologic ce se bazează pe activitatea microorganismelor, iar obținerea unor produse cu însușiri noi și calitate garantată depinde în mare măsură de tulpinile microbiene care transformă materia primă.

În tehnologia produselor lactate acide s-au realizat puține progrese în comparație cu cele obținute la fabricarea altor categorii de produse lactate. Aceste produse se pretează mai greu la mecanizarea procesului datorită necesității menținerii unei anumite consistențe caracteristice fiecărui sortiment, ceea ce exclude manevrarea în vrac a produselor.

În acest context, progresele se pot face simțite în special la selectarea de noi tulpini de microorganisme care să confere produsului fermentat însușiri organoleptice și terapeutice superioare, precum și la îmbunătățirea însușirilor acestor tulpini de microorganisme prin optimizarea condițiilor de cultivare a lor.

Streptococii termofili și lactococii mezofili sunt cele mai utilizate culturi bacteriene pentru fabricarea produselor lactate fermentate la scară industrială. Capacitatea bacteriilor lactice termofile de a crește și se multiplica la temperaturi de 37-45 °C este o condiție importantă fiind asociată cu procesul tehnologic de fabricare a iaurtului, laptelui covăsit și diverselor brânzeturi [142].

Laptele crud și produsele lactate de fermentare spontană sunt sursele principale de izolare a bacteriilor lactice, inclusiv și a tulpinilor de *Streptococcus thermophilus*. Tulpinile *S. thermophilus* transformă lactoză în acid lactic, proces ce contribuie la coagularea laptelui și împiedică dezvoltarea microorganismelor patogene.

În ultimul timp a crescut interesul cercetătorilor față de bacteriile lactice termofile, lucru în mare măsură legat de dezvoltarea industriei produselor lactate din lume, precum și de valorificarea tulpinilor noi de bacterii lactice în calitate de tulpini starter. În Republica Moldova până în prezent această tendință se reliefează slab, exprimându-se printr-un nivel insuficient de utilizare a culturilor starter autohtone.

Astfel, mulți specialiști din industria laptelui atât din republică noastră, cât și de peste hotare, recunosc necesitatea și importanța utilizării tulpinilor autohtone de bacterii lactice în scopul ameliorării și eficientizării tehnologiilor de preparare a produselor lactate fermentate.

De aceea, la prima etapă a cercetărilor noastre ne-am propus să realizăm selectarea unor tulpini noi de bacterii din specia *S. thermophilus* în scopul utilizării lor la prepararea culturilor starter autohtone pentru procesarea produselor lactate fermentate.

Cercetările la acest capitol au fost realizate conform etapelor următoare:

1. Izolarea culturilor pure de bacterii lactice din specia *S. thermophilus*.
2. Descrierea însușirilor culturale și morfologice ale tulpinilor izolate.
3. Descrierea însușirilor fiziologice și biochimice ale tulpinilor de *S. thermophilus*.
4. Identificarea moleculară a bacteriilor lactice izolate.
5. Descrierea proprietăților tehnologice ale tulpinilor autohtone de *S. thermophilus*.
6. Studiul influenței factorilor externi asupra sintezei exopolizaharidelor în condiții de cultivare periodică a tulpinilor de *S. thermophilus*.

3.1. Izolarea culturilor pure de bacterii lactice din specia *Streptococcus thermophilus*

Calitatea și valoarea nutritivă a produselor lactate, în mare măsură, depind de activitatea biotehnologică a bacteriilor lactice, de selectarea corectă a consorțiilor pentru elaborarea culturilor starter și respectarea procesului tehnologic de producere [7].

Selectarea bacteriilor lactice pentru industria laptelui include izolarea culturilor din sursele naturale, selectarea și cercetarea proprietăților lor, care determină valoarea industrială.

Pentru izolarea bacteriilor lactice din specia *S. thermophilus* este necesar să se utilizeze mediul, care satisface necesitățile lor nutriționale. Cât privește cerințele nutriționale, bacteriile lactice sunt printre cele mai pretențioase organisme. Ele se caracterizează prin exigențe înalte față de componența mediilor de cultură utilizate pentru izolarea și studierea lor. Ele necesită pentru creștere și dezvoltare compuși azotați, glucide, vitamine, minerale ș. a. Bacteriile lactice termofile din specia *S. thermophilus*, conform Bergey, sunt capabile să se dezvolte la temperaturi cuprinse între 42 – 45 °C. Temperatura optimală de creștere se încadrează între 37 – 40 °C [125].

Laptele este cel mai complet mediu pentru selectarea culturilor de bacterii lactice. Atunci când se izolează bacteriile lactice este oportun de a folosi în calitate de mediu de cultură laptele degresat steril, care este mai favorabil pentru dezvoltarea microorganismelor lactice, comparativ cu cel gras. Astfel, are loc o selecție naturală a tipurilor de bacterii lactice care posedă activitate biochimică înaltă.

În scopul selectării și identificării celor mai active tulpini din punct de vedere biotehnologic s-au efectuat teste care evaluează capacitatea bacteriilor lactice de a fermenta laptele. Testul constă din următoarele etape:

- sterilizarea laptelui degresat;
- controlul sterilității laptelui prin termostatare timp de 48 ore;
- inocularea izolatelor în lapte;
- termostatarea;
- analiza probelor de lapte fermentat.

Calitatea produselor lactate depinde de mai mulți factori, inclusiv de gradul de tratare termică, care este una dintre cele mai importante condiții pentru obținerea produsului microbiologic inofensiv. La sterilizare în lapte se formează aminoacizi liberi și acid formic, care au o influență favorabilă asupra creșterii și multiplicării lactobacteriilor. Tratamentul termic al laptelui are scopul de a distruge microflora tehnologic dăunătoare și patogenă.

În același timp, trebuie să se ia în considerare că în cazul încălcării procesului de sterilizare (temperatura ridicată, durata prelungită) laptele devine brun din cauza formării complexelor proteo-glucidice, prezența cărora afectează creșterea unor tipuri de microorganisme lactice. De aceea, sterilizarea laptelui se efectuează la 110 - 112 °C (0,5 atm.) timp de 40 min într-un balon de sticlă cu o capacitate de 0,5 l.

Pentru a monitoriza sterilitatea laptelui probele se termostatează timp de 48 ore și se examinează microscopic. Lipsa coagulării și a celulelor de microorganisme indică sterilitatea laptelui.

Pentru izolarea culturilor pure de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* au fost prelevate probe de lapte crud și produse lactate de fermentare spontană din 12 regiuni ale Republicii Moldova: Dondușeni, Edineț, Florești, Soroca, Ungheni, Orhei, Chișinău, Anenii Noi, Căușeni, Taraclia, Cahul, Vulcănești. Culturile s-au incubat la 37 °C, până la formarea coagulului. Cultivarea culturii îmbogățite a fost realizată în lapte steril degresat (0,1% de grăsime) până la formarea coagulului dens fără erupții. După fiecare însămânțare conținutul eprubetelor a fost testat la puritate de cultură. Culturi pure se obțin prin însămânțări zilnice (nu mai puțin de 10 ori).

Au fost studiate circa 300 probe de lapte crud și produsele lactate de fermentare spontană, din care au fost obținute 7 izolate bacteriene cu proprietăți caracteristice speciei *Streptococcus thermophilus*. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 3.1.

Fiecare tulpină nouă de microorganisme a fost studiată minuțios pentru obținerea unei caracteristici cât mai complete. În acest caz s-a ținut cont de condiția că un organism poate fi atribuit unui taxon numai în cazul în care acest taxon este deja cunoscut, iar microorganismele identificate trebuie să fie denumite în conformitate cu *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (www.bacterio.net).

Tabelul 3.1. Originea tulpinilor studiate

Nr.crt.	Codul tulpinii	Originea	
1	L 12	mun. Chișinău	
2	L 65	r. Cahul	
3	L 102	r. Dondușeni	
4	L 109	r. Anenii Noi	
5	L 177	r. Taraclia	
6	L 232	r. Soroca	
7	L 292	r. Florești	

Identificarea unui microorganism necunoscut este un proces succesiv de atribuire la un oarecare grup mare de bacterii, caracterizate prin proprietăți comune, iar apoi de clasare într-o familie din cadrul grupului, fiind comparat cu un microorganism ce face parte din această familie. La etapa finală de testare sunt comparate proprietățile morfologice, culturale, biochimice, patogene cu orice tip de bacterie din cadrul speciei [143].

3.2. Caracteristicile culturale și morfologice ale tulpinilor autohtone noi de *Streptococcus thermophilus*

Particularitățile culturale ale microorganismelor sunt determinate de caracterul creșterii pe medii nutritive. Acestea sunt caracteristici importante de diagnosticare fiind constante pentru fiecare specie de bacterii.

Cercetările caracterelor culturale și morfologice ale tulpinilor autohtone de *S. thermophilus* izolate au fost efectuate pe mediul solid – lapte hidrolizat agarizat.

La examinarea proprietăților culturale s-au determinat: diametrul coloniei, forma (circulară, punctiformă, filamentoasă, neregulată, lenticulară etc.), caracterul marginii (netedă, ondulată, filamentoasă, lobată etc.), suprafața (plată, convexă, bombată, acuminată etc.), culoarea (alba, galbenă, crem); structura (omogenă, heterogenă, granulată etc.) și de consistența (vâscoasă, untoasă, uscată etc.).

Aspectul coloniilor de *Streptococcus thermophilus* în viziune reală și mărită este ilustrat în Figura 3.1.

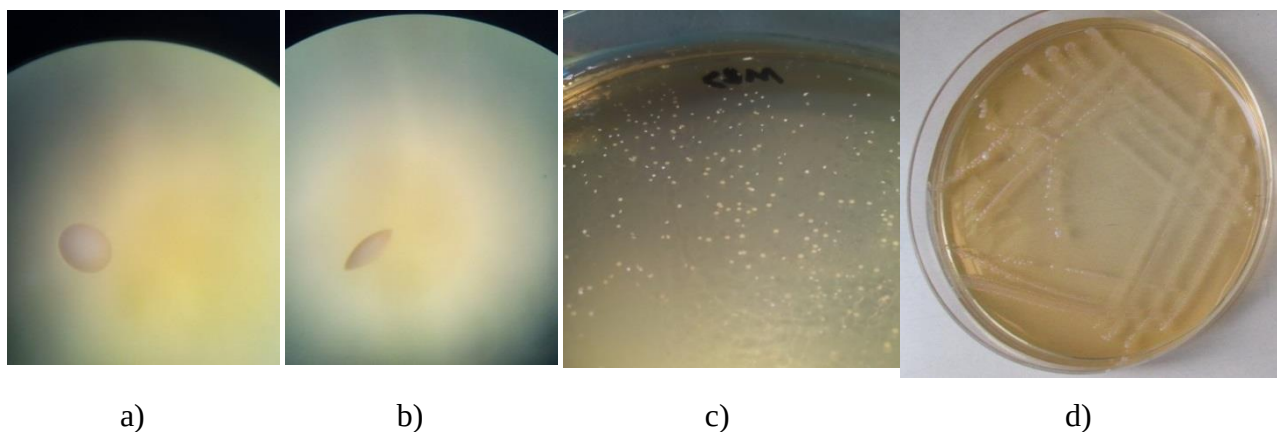


Fig. 3.1. Aspectul coloniilor *S. thermophilus*: a), b) – colonie mărită în 6 ori, c), d) – aspect general al culturii pe mediul agarizat de lapte hidrolizat (submers și de suprafață) (Autor foto Cartășev A.).

Din Figura 3.1 se vede, că tulpinile selectate la cultivare în mediu agarizat de lapte hidrolizat formează colonii ce prezintă următoarele caracteristici: de suprafață – rotunde, formă de picătură cu margini netede (de tip S); de profunzime – lenticulare, culoare alb-cremă; după dimensiuni - mici (până la 1 mm), cu consistență păstoasă la izolatele L12, L102, L109, L323, L292 și untoasă la izolatele L65 și L177 [10, 11].

Evaluarea inițială a morfologiei celulelor bacteriene este o etapă foarte importantă pentru identificarea finală. La determinarea proprietăților morfologice ale bacteriilor din specie *S. thermophilus*, au fost studiați următorii parametri: forma și localizarea celulelor, mobilitatea acestora, dimensiunea, caracteristica colorării după Gram.

Studiul morfologiei celulelor tulpinilor de bacterii lactice se bazează pe aprecierea microscopică a preparatelor colorate și fixate.

Se știe că de lungimea lanțurilor de streptococii lactici depinde viscozitatea coagulului format și capacitatea de reținere a apei [131]. De aceea la studierea proprietăților reologice a culturilor starter trebuie să se ia în considerare impactul lor la formarea structurii coagulului. În acest sens, tulpinile selectate au fost investigate microscopic. Rezultatele microscopiei cu obiectiv cu imersie (puterea de mărire 100x) sunt reprezentate în Figura 3.2.

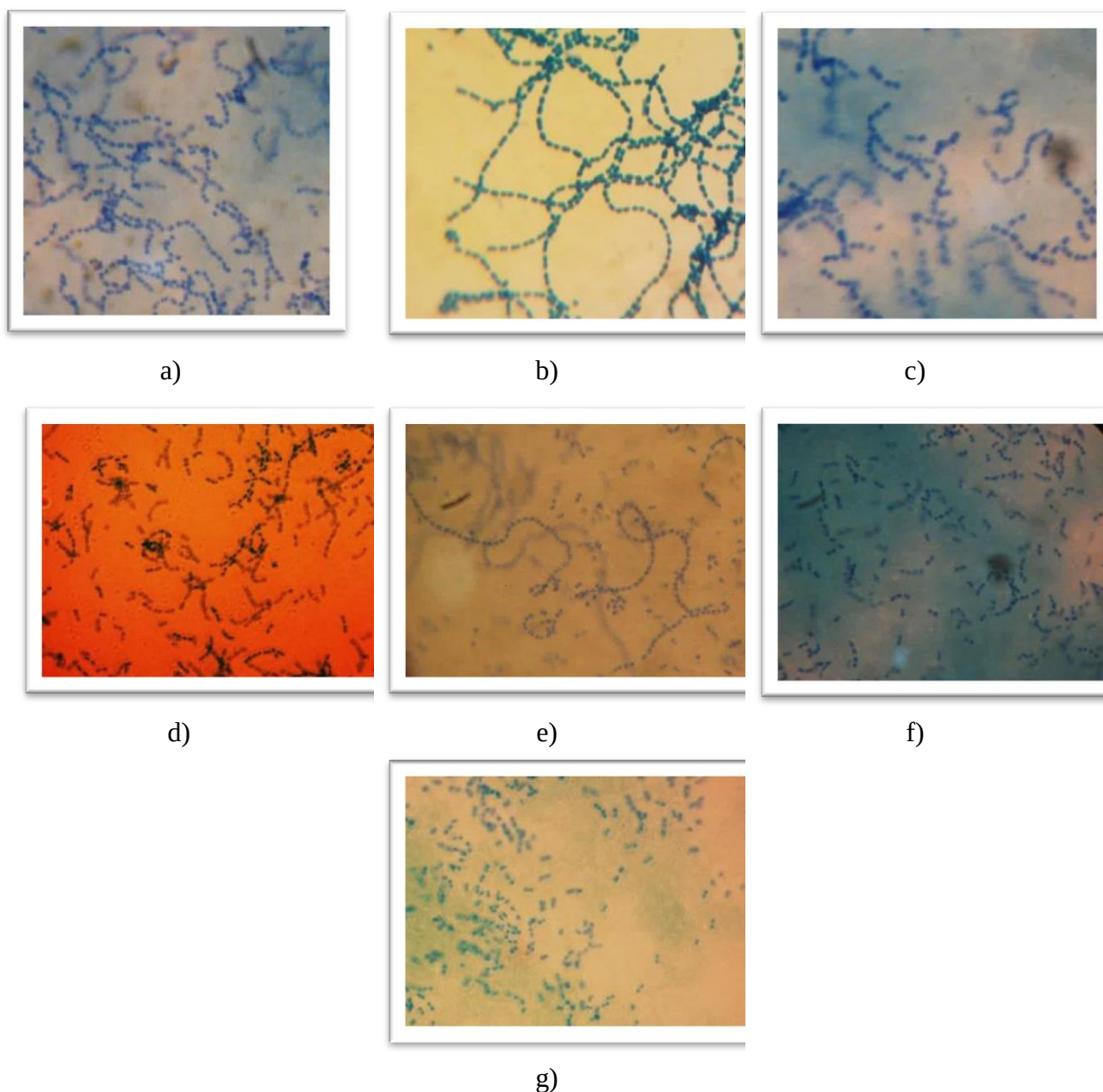


Fig. 3.2. Aspectul microscopic al tulpinilor: a) L12, b) L65, c) L102, d) L109, e) L177, f) L232, g) L292. Microscopie optică- obiectiv 100 x, (Autor foto Cartășev A.).

Microscopia izolatelor de bacterii lactice termofile a arătat, că toate tulpinile noi izolate din diferite regiuni ale Republicii Moldova sunt Gram pozitive, prezintă coci plasați în lanțuri de diferite lungimi, ceea ce este caracteristic speciei *S. thermophilus* [7]. Prevalarea în preparatele microscopice ale *S. thermophilus* L65 și *S. thermophilus* L177 a lanțurilor lungi poate indica asupra unei capacități sporite de reținere a apei coagulului.

3.3. Caracteristicile fiziologice și biochimice ale tulpinilor autohtone noi de *Streptococcus thermophilus*

Studierea proprietăților fiziologice ale microorganismelor este necesară nu numai din punct de vedere al obținerii biomasei, cunoașterea lor servește la identificarea caracteristicilor distinctive ale microorganismelor și posibilității utilizării practice a acestora. Acești parametri stau la baza majorității proceselor biotehnologice microbiene. Toate acestea evidențiază importanța studierii proprietăților fiziologice și a necesităților nutritive ale culturilor de microorganisme.

Printre bacteriile lactice termofile ce fermentează laptele trebuie de menționat bacteriile *Enterococcus faecalis* și *E. faecium*, anterior atribuite aceluiași gen *Streptococcus* [116]. Aceste specii de bacterii pot fi adesea izolate din produse lactate fermentate, dar reprezentanții genului *Enterococcus* nu au statut GRAS, adică nu sunt sigure pentru a fi utilizate în producere. În plus, enterococii sunt capabili de a forma compuși nedoriti – amine presoare, care pot afecta în mod negativ sănătatea consumatorului. De aceea, este importantă identificarea corectă a tulpinilor de bacterii care vor fi utilizate în calitate de culturi starter.

Bacteriile lactice din genul *Enterococcus* se aseamănă în multe privințe cu cele din genul *Streptococcus*. Principalii parametri după care se disting genurile *Streptococcus* și *Enterococcus* în procesul identificării lor, sunt dezvoltarea după 30 min de incubare la 60 °C, capacitatea de a fermenta esculina, capacitatea de a se dezvolta în mediul cu bilă și cu diferite concentrații de NaCl.

Trebuie de remarcat faptul că bacteriile lactice din genul *Enterococcus* sunt mai rezistente la temperaturi ridicate și sunt capabile să crească la o temperatură mai mare de incubare decât cele din genul *Streptococcus*. De asemenea, se remarcă și alți indici distinctivi ai bacteriilor lactice din specia *Enterococcus* – capacitatea lor de fermentare a esculinei și a unui număr mare de carbohidrați, de creștere în mediul cu 6%NaCl, potențial de care nu dispun streptococii lactici [131].

Capacitatea de creștere la diferite concentrații de clorură de sodiu este o caracteristică importantă și ușor de elucidat. Prin acest parametru pot fi ușor diferențiate bacteriile lactice termofile din genurile *Streptococcus* și *Enterococcus*. În conformitate cu determinantul Bergey, bacteriile de *S. thermophilus* și alți streptococi nu au capacitatea de creștere în mediul cu concentrația de NaCl mai mare de 2%, pe când enterococii *E. faecium* și *E. faecalis* posedă această capacitate.

Specificul tulpinilor din specia *S. thermophilus* constă în activitatea zaharolitică relativ slabă. Se consideră că tulpinile tipice ale acestei specii fermentează numai lactoză, glucoză, zaharoză și nu fermentează maltoza, manoză, manitolul, arabinoza, sorbitolul, xiloza, galactoza și alți carbohidrați. Spre deosebire de streptococii termofili, enterococii fermentează manitolul, arabinoza, manoză, dextrina, galactoza, maltoza.

În literatura de specialitate sunt descrise tulpini „atipice” de *S. thermophilus*, caracterizate prin rezistență la condițiile nefavorabile, care fermentează maltoza și provoacă hemoliză, adică, au unele proprietăți fiziologice comune cu enterococii [162].

De aceea, când se efectuează diferențierea lor se ia în considerare faptul că enterococii sunt mai rezistenți la condițiile nefavorabile.

Astfel, au fost studiate proprietățile fiziologo-biochimice ale tulpinilor autohtone *S. thermophilus* și abilitatea lor de a utiliza o serie de carbohidrați. Principalele însușiri fiziologo-biochimice ale tulpinilor studiate: rezultatul colorației Gram, producerea de CO₂, activitatea catalazei, hidroliza argininei, rezistența la temperaturi ridicate, creșterea în mediu salin, alcalin, și în mediul cu albastru de metilen - sunt prezentate în Tabelul 3.2.

Tabelul 3.2. Proprietățile fiziologo-biochimice ale tulpinilor *S. thermophilus* (la 40°C)

Numărul tulpinii	Caracteristici									
	Colorația Gram	Producerea CO ₂ din glucoză	Producerea catalazei	Producerea amoniacului din arginină	Rezistența la încălzire 60°C timp de 30 min	Rezistența la NaCl, %		Creșterea în albastru de metilen, %		Creșterea în mediul alcalin, pH
						2,0	4,0	0,01	0,1	
L 12	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
L 65	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
L 102	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
L 109	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
L 177	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
L 232	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
L 292	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-

Notă: + reacție pozitivă; - reacție negativă

Datele din tabelul 3.2 indică asupra faptului că tulpinile de microorganisme testate:

- sunt Gram pozitive;
- nu produc catalaza;
- rezistă la temperatura de 60°C timp de 30 min, dar la minutul 32 nu s-au mai înregistrat culturi viabile;
- nu cresc pe mediu de NaCl cu concentrația 4%, dar se dezvoltă la concentrația de 2% de clorură de sodiu;

- nu sunt rezistente la 0,1% albastru de metilen;
- nu cresc în mediul alcalin cu pH 9,2.

Toate însușirile descrise pentru tulpinile noi izolate corespund parametrilor fiziologo-biochimici caracteristici speciei *Streptococcus thermophilus* și indică necesitatea continuării testelor de identificare a proprietăților de fermentare a carbohidraților [7, 54].

Determinarea capacității de fermentare a diferitor carbohidrați prezintă o etapă crucială la identificarea bacteriilor lactice, ținând cont de faptul că fiecare tulpina poate asimila un număr limitat de surse de carbon [131].

Rezultatele cercetărilor efectuate sunt prezentate în Tabelul 3.3. Analizând datele prezentate în tabel, putem observa că tulpinile fermentează lactoza, glucoza și zaharoza. Toate tulpinile cercetate nu au fermentat esculina, ceea ce reprezintă un argument în plus în favoarea apartenenței tulpinilor studiate la specia *S. thermophilus* [8].

Un alt parametru ce deosebește culturile de bacterii lactice termofile de cele mezofile este testul de coagulare/reducere a laptelui turnesolat. Rezultatele acestui test sunt vizibile în imaginea prezentată în Figura 3.3.

Tabelul 3.3. Fermentarea hidraților de carbon de către tulpinile izolate

Numărul tulpinii	Hidrocarburi										
	Glucoză	Lactoză	Zaharoză	Galactoză	Ramnoză	Maltoză	Rafinoză	Manoză	Sorbită	Glicerină	Esculină
L 12	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L 65	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L 102	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L 109	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L 177	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L 232	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L 292	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Notă: + fermentează; - nu fermentează

Culoarea roz, vizibilă în Figura 3.3 indică producerea lentă a acidului lactic, ceea ce este foarte favorabil pentru utilizarea acestor tulpini în calitate de culturi starter.



Fig. 3.3. Testul de coagulare/reducere a laptelui turnesolat (Autor foto Cartășev A.).

Astfel, studiul proprietăților morfologice, culturale, fiziologice și biochimice a culturilor noi izolate din lapte și produse lactate autohtone, a permis de a stabili apartenența tulpinilor testate la specia *Streptococcus thermophilus*.

3.4. Identificarea tulpinilor izolate de *Streptococcus thermophilus* prin aplicarea tehnicilor biologiei moleculare

Pentru identificarea tulpinilor de microorganisme până nu demult se utilizau preponderent testele tradiționale fenotipice, bazate pe studiul particularităților morfologice, fiziologice și biochimice ale culturilor. Însă utilizarea exclusivă a tehnicilor tradiționale nu întotdeauna permite selectarea culturilor sigure și cu un potențial biotehnologic înalt de utilizare în calitate de culturi starter pentru fabricarea produselor lactate fermentate. Datorită faptului că bacteriile lactice au proprietăți similare, apar dificultăți în identificarea speciilor și diferențierea lor la nivel intraspecific [96].

În ultimii ani, pentru identificarea și studierea bacteriilor lactice izolate din ecosistemele alimentare sunt aplicate tot mai larg tehnicile biologiei moleculare. Tipizarea genetică permite evaluarea și diferențierea rapidă a tulpinilor noi izolate. Compararea proprietăților fenotipice și genotipice ale tulpinilor *S. thermophilus* dezvoltate în lapte crud și produsele lactate fermentate permite obținerea tulpinilor valoroase care pot fi utilizate pe scară industrială la fabricarea produselor lactate.

Streptococii termofili, izolați din diverse surse naturale și produse lactate, în cele mai multe cazuri, sunt tulpini care aparțin genurilor *Streptococcus* și *Enterococcus*. Bacteriile lactice termofile din specia *Streptococcus thermophilus* sunt reprezentanții „utili” în ce privește aplicarea lor în practică. Mulți savanți remarcă însă dificultăți în diferențierea și identificarea genurilor bacteriene *Streptococcus* și *Enterococcus*, folosind doar metodele de clasificare fenotipice [143]. Acești autori au descris necoresponderea caracteristicilor fenotipice clasice

acestor genuri, cum ar fi intervalul temperaturilor de creștere tipice, rezistența la antibiotice, fermentarea carbohidraților, capacitatea de a crește pe un mediu care conține esculină sau bilă, caracteristici ce pot uneori fi întâlnite la reprezentanții ambelor specii. Tulpinile de streptococi, ce nu pot fi identificate sigur, din cauza asemănării caracteristicilor morfologice și biochimice cu cele ale enterococilor, sunt numite tulpini „atipice“ de *S. thermophilus* [162].

Deci, clasificarea rapidă și specifică a bacteriilor este o sarcină importantă în microbiologie, care astăzi se realizează folosind, de rând cu metodele tradiționale, și metode ale biologiei moleculare, ce oferă o caracterizare genetică destul de exactă a tulpinilor cercetate.

Reieșind din cele expuse, după izolarea și identificarea tulpinilor de bacterii lactice prin teste tradiționale, statutul taxonomic și variabilitatea intraspecifică ale celor 5 tulpini de *S. thermophilus* selectate a fost verificat prin aplicarea următoarelor tehnici:

1. Amplificarea fragmentelor ADNr 16S cu utilizarea reacției de polimerizare în lanț (PCR- Polimerase Chain Reaction) folosind primeri specifici.
2. Amplificarea secvențelor repetitive la nivelul ADN cromozomial prin tehnica Rep-PCR.
3. Spectroscopia în infraroșu cu transformantă Fourier (FTIR).

Amplificarea fragmentelor ADNr 16S cu utilizarea reacției de polimerizare în lanț (PCR):

Reacția de amplificare PCR a regiunii intergenice 16S-23S permite tipizarea bacteriilor în principal la nivel de specie și subspecie. Gena țintă cel mai frecvent utilizată pentru identificarea bacteriană este gena ADNr 16S, de aproximativ 1500 bp care codifică o porțiune din subunitatea ribozomală 30S [82]. Analiza secvenței genelor ADNr 16S se utilizează pe scară largă ca instrument taxonomic și este recunoscută drept o metodă eficientă pentru identificarea bacteriilor [72].

Pentru analiza filogenetică, secvența nucleotidică a genei ADNr 16S obținută pentru tulpinile studiate a fost comparată cu secvențele tulpinilor de referință.

Cercetările de identificare a tulpinilor autohtone de *S. thermophilus* au inițiat cu izolarea de ADN total, urmată de cuantificarea ADN-ului izolat prin fluorimetrie. Pentru efectuarea reacției de amplificare PCR este necesară o cantitate minimă de ADN de 15 ng/μl. Rezultatele determinării concentrației ADN-ului pentru fiecare tulpină sunt prezentate în tabelul 3.4.

Tabelul 3.4. Concentrația ADN-ului izolat din tulpinile autohtone de *S. thermophilus*

Codul tulpinii	Concentrația ADN, ng/ μl
L 12	108,01
L 65	87,68
L 102	43,76
L 109	32,82
L 177	151,4

Datele obținute demonstrează că au fost obținută o cantitate suficientă pentru efectuarea reacției de amplificare PCR.

Amplificarea secvenței genei ARNr 16S a fost efectuată cu ajutorul a doi primeri 27f și 1492r. În calitate de tulpini de referință au fost utilizate *S. thermophilus* A737 din Colecția Cehă de Microorganisme, Brno, Republica Cehă și *S. thermophilus* 1241 din Colecția de Microorganisme a Departamentului de microbiologie, biologie moleculară și biotehnologie al Institutului de Cercetare a Alimentelor din Slovacia.

Pentru evidențierea produșilor de amplificare a fost efectuată analiza electroforetică, rezultatele căreia sunt prezentate în Figura 3.4.

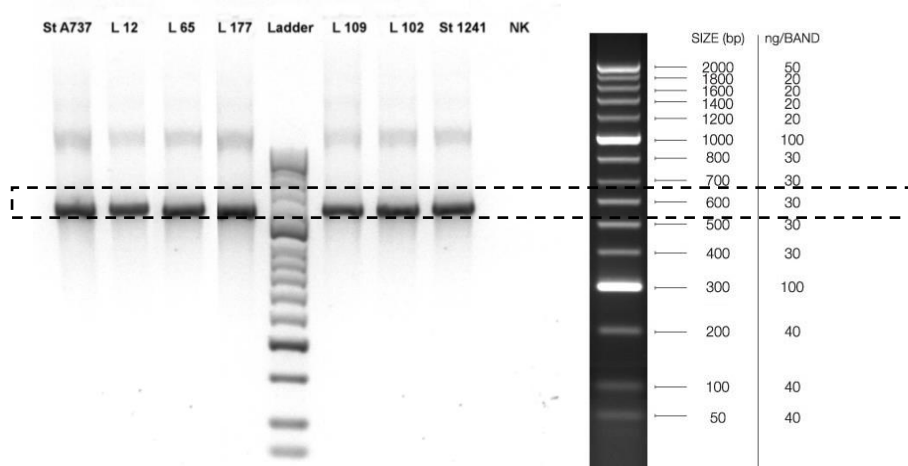


Fig. 3.4. Profilul electroforetic obținut în urma amplificării PCR a secvenței genei ADNr 16S cu primeri specifici, la 7 tulpini de bacterii lactice. Ladder=markerul HipperLadder 50bp, NK=control negativ.

Analiza profilurilor electroforetice ne permite să afirmăm, ca toate tulpinile au generat în gel o bandă comună, de aproximativ 600 bp și că similaritatea secvențelor genelor ADNr 16S ale celor 7 tulpini analizate constituie 99%. Deci, tulpinile de bacterii lactice, selectate și identificate anterior prin metode fenotipice ca aparținând speciei *S. thermophilus*, își confirmă acest statut taxonomic și după efectuarea analizei secvenței genei ADNr 16S. Rezultatele analizei filogenetice a reprezentanților tipici de *S. thermophilus* sunt în concordanță cu rezultatele altor studii, sugerând că tehnica de secvențiere a genei ADNr 16S este relevantă pentru identificarea speciilor de bacterii lactice din surse naturale [117].

Amplificarea secvențelor repetitive la nivelul ADN cromozomial prin tehnica Rep-PCR:

Evaluarea ulterioară a eventualelor diferențe la nivel molecular dintre tulpinile utilizate în studiu a fost efectuată prin analiza secvențelor genomice repetate (metoda Rep-PCR). Studiul secvențelor repetate a fost realizat prin analiza profilurilor electroforetice obținute în urma amplificării prin PCR cu primerul specific GTG5. Gelurile de electroforeză au fost fotografiate

cu o camera digitală CANON PowerShot SX170, iar lungimea fragmentelor obținute a fost măsurată în raport cu benzile marker-ului HiperLadder 50bp.

Profilul electroforetic Rep-PCR al tulpinilor autohtone de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* sunt prezentate în Figura 3.5.

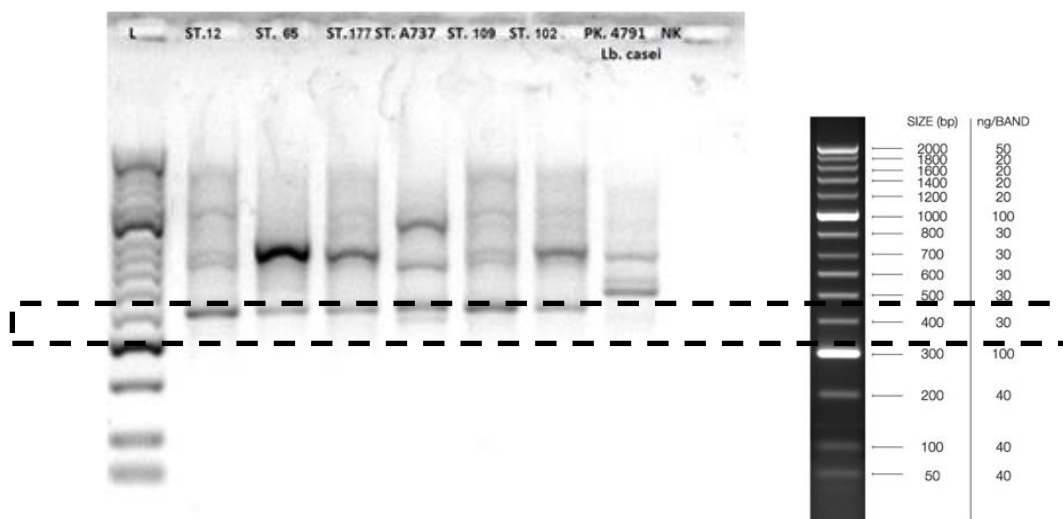


Fig. 3.5. Profilul electroforetic rep-PCR a tulpinilor autohtone de *S. thermophilus*.
L=HiperLadder 50bp; ST A737=cultură de referință, PK 4791=Control pozitiv (*Lactobacillus casei* 4791); NK=Control negativ.

Benzile profilurilor electroforetice obținute au fost clare, bine individualizate, observându-se de 2 până la 7 benzi. Toate tulpinile au generat pe gel o bandă comună, aproximativ de 400 pb.

În rezultatul măsurărilor efectuate s-a obținut o dendrograma, cu ajutorul programului GenCompare 6.6.11 (Figura 3.6). Astfel, prezența sau absența benzilor electroforetice a dus la o asociere a tulpinilor în grupuri, evidențiind similaritatea acestora.

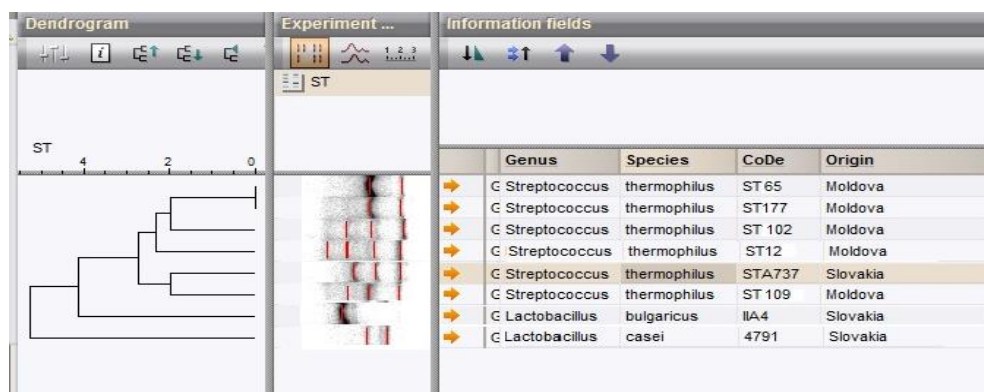


Fig. 3.6. Dendrograma generală pe baza profilurilor electroforetice obținute în urma amplificării PCR a secvențelor genomice repetate cu primer-ul GTG5. Scara exprimă similaritatea în unități relative.

Din dendrogramă (Figura 3.7) se poate observa gruparea foarte strânsă a unor tulpini autohtone. Astfel, tulpinile *S. thermophilus* L 65 și L 177 sunt grupate împreună, ele fiind izolate din regiunea sudică a Republicii Moldova (L 65 – Cahul, L 177 – Taraclia). Pe de altă parte, dendrograma grupează și tulpini care obținute din diferite țări. Este cazul tulpinilor *S.thermophilus* L 109 și A737, colectate din Anenii Noi, respectiv republica Cehă. Cele două tulpini *S.thermophilus* L 12 și L 102 colectate din centrul republicii și din nordul nu sunt grupate împreună, dar aparțin speciei *S. thermophilus*.

Prin această dendrogramă se confirmă capacitatea secvențelor genomice repetate de a diferenția tulpinile de bacterii lactice. Dendrograma rezultată nu reflectă relațiile evolutive dintre tulpinile studiate, întrucât secvențele genomice repetate nu prezintă markeri filogenetici. Ele au relevanța doar prin prezența sau absența lor, ceea ce nu înseamnă că reflectă relațiile în timp dintre tulpini.

Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier:

Identificarea microorganismelor prin această metodă se bazează pe compoziția chimică a materialului celular. Spectroscopia moleculară a fost introdusă drept o abordare posibilă de identificare cu succes limitat în anul 1950 [35]. Utilizarea pe larg a spectroscopiei vibraționale pentru identificarea bacteriilor la acel moment nu s-a practicat din cauza posibilităților tehnice limitate la acel moment. Odată cu apariția spectroscopiei în infraroșu cu transformată Fourier și posibilitatea de a analiza datele cu ajutorul calculatoarelor la sfârșitul anilor 80 - 90 al secolului XX, Naumann și colaboratorii săi au reintrodus metoda FTIR pentru analiza *in situ* a celulelor bacteriene și analiza spectrală complexă pentru a identifica, diferenția și clasifica bacteriile [119]. De atunci, spectroscopia FTIR se aplică cu succes pentru detectarea, identificarea și clasificarea bacteriilor din diferite specii, în special patogene. [128].

Spectroscopia FTIR nu este doar o metodă de identificare bacteriană, ea oferă de asemenea informații despre metabolismul bacterian, fazele de dezvoltare, și rezistența la antibiotice [37]. Actualmente spectroscopia FTIR se utilizează pe larg în domeniul microbiologiei alimentare, caracterizându-se prin simplitatea pregătirii probelor analizate și viteza mare de analiză [114].

Avantajele utilizării metodei de spectroscopie FTIR pentru analiza microorganismelor sunt: rapiditate și simplitate relativă; cantitatea mică de suspensie analizată; instrumental și software accesibile; costul relativ mic comparativ cu alte metode utilizate [94].

Există și anumite dezavantaje a acestei metode, cum ar fi procesarea matematică dificilă, deoarece spectrele obținute conțin benzi suprapuse datorită complexității probei. Există, de asemenea, anumite probleme practice cu instrumentarul FTIR, cum ar fi sensibilitatea electronică, ceea ce impune ca instrumentul să funcționeze fără întreruperi, sau sensibilitatea optică la umiditatea aerului, care necesită schimbarea frecvență a cartușelor de desecare [120].

Spectroscopia FTIR a bacteriilor este specifică pentru o anumită tulpină și prezintă caracteristicile spectrale ale componentelor celulare, cum ar fi acizii grași, proteinele membranare și intracelulare, polizaharidele și acizii nucleici.

Spectroscopia FTIR poate oferi informații suplimentare la datele fenotipice și genotipice care pot ajuta la stabilirea unei clasificări taxonomice mai robuste. Rezultatele identificării depind de calitatea și mărimea bazei de date, precum și de prelucrarea matematică adecvată. Spectrul FTIR al celulelor microbiene intacte constituie o imagine a compoziției lor chimice generale, dar evident că componentele unor structuri (în principal membrana și peretele celular) au o influență decisivă asupra spectrului [99].

Scopul acestui studiu a fost caracterizarea bacteriilor lactice autohtone *S. thermophilus* prin spectroscopia FT-IR la cultivate pe mediul M17 cu lactoză și agitare permanentă. Cercetările au fost efectuate în Departamentul de microbiologie, biologie moleculară și biotehnologie al Institutului de Cercetare a Alimentelor în cadrul Centrului Național de Agricultură și Produse Alimentare din Bratislava, Slovacia. În calitate de tulpină de referință a servit *S. thermophilus* A737 din Colecția Cehă de Microorganisme, Brno, Republica Cehă.

Înregistrarea spectrelor a 6 probe (5 izolate bacteriene și 1 cultură de referință) s-a realizat în domeniul spectral cuprins între 500 și 4000 cm^{-1} . Fiecare probă a fost scanată de 64 ori în 2 repetări. Maxime de absorbantă au fost înregistrate la lungimile de undă de $\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1200 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$. Benzile caracteristice ale spectrului tulpinilor de *S. thermophilus* studiate sunt reprezentate în Figura 3.7.

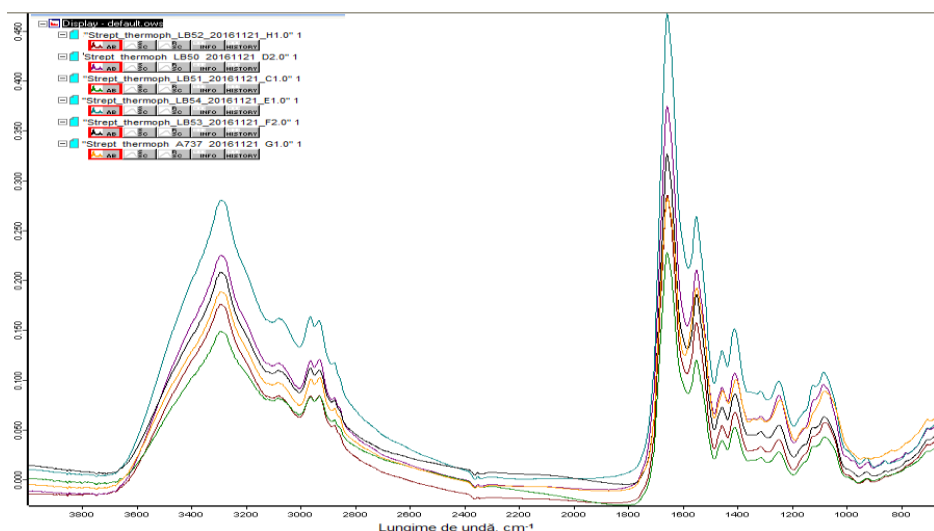


Fig. 3.7. Spectrele de absorbție FT-IR caracteristice bacteriilor din specia *S.thermophilus*.

Coeficientul de corelare a momentului produsului Pearson a fost considerat pentru tulpinile studiate pentru întreg domeniul spectral de la 4000 cm^{-1} până la 500 cm^{-1} [64]. Naumann a stabilit că cea mai mare corelație la tulpinile de bacterii se atinge în următoarele intervale; 3000 cm^{-1} până la 2800 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} până la 1400 cm^{-1} și 900 cm^{-1} până la 700 cm^{-1} [100].

Conform acestui studiu, s-a constatat corelarea tulpinilor autohtone cu cea de referință la nivel de 99%.

Analiza comparativă a spectrelor de absorbție FT-IR caracteristice tulpinilor *S. thermophilus* a permis realizarea dendrogramei reprezentate în Figura 3.8.

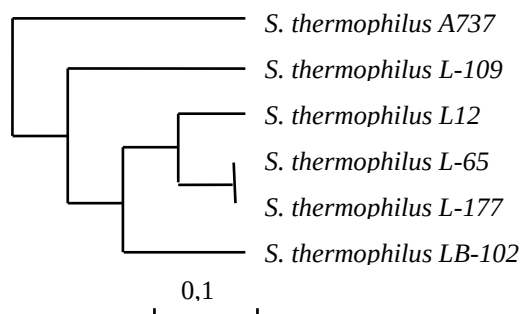


Fig. 3.8. Dendrograma tulpinilor *S. thermophilus* autohtone conform spectroscopiei FT-IR

Rezultatele obținute sugerează că metoda FTIR propusă este potrivită pentru identificarea bacteriilor lactice din specia *S. thermophilus* [139].

În urma cercetărilor au fost stabilite caracteristicile specifice ale tulpinilor autohtone de *S. thermophilus* cu ajutorul tehnologiilor de spectroscopie FTIR și PCR. Datele obținute au fost introduse în Baza de date a Departamentului de microbiologie, biologie moleculară și biotehnologie al Institutului de Cercetări ale Alimentelor în cadrul Centrului Național de Agricultură și Produse Alimentare din Bratislava, Slovacia, pentru studierea și efectuarea analizei comparative a tulpinilor din această specie.

3.5. Proprietățile tehnologice ale tulpinilor autohtone noi de *Streptococcus thermophilus*

Următoarea etapă a cercetării a fost consacrată determinării proprietăților tehnologice ale microorganismelor studiate.

Din sortimentul vast de produse alimentare consumatorii preferă acele produse, ce posedă caracteristici suplimentare, cum ar fi autenticitatea, beneficiile adiacente pentru sănătate, valoarea nutritivă, gustul neobișnuit etc. De aceea o sarcină actuală a industriei laptelui este fabricarea produselor lactate de calitate înaltă, care corespund cerințelor și necesităților consumatorilor.

Proprietățile organoleptice, fizico-chimice, microbiologice, reologice etc. ale produselor lactate depind de compoziția culturilor starter, de activitatea lor și, în mare măsură, de caracteristicile biochimice și tehnologice ale culturilor individuale care alcătuiesc culturile starter [8].

Activitatea fermentativă a tulpinilor de bacterii lactice (exprimată în timp, în care cultura este capabilă să aciduleze laptele) este cel mai important parametru tehnologic de apreciere a tulpinilor pentru utilizarea lor în producere [9]. Viteza de coagulare a laptelui are o importanță practică mare în procesul de fabricare a produselor lactate. Intensificarea procesului de fermentare a laptelui, accelerarea maturării și îmbunătățirea calității produselor lactate poate fi realizată numai atunci când sunt utilizate tulpini de bacterii lactice active din punct de vedere biochimic [8].

Este cunoscut faptul că activitatea înaltă de acidogeneză mărește eficiența economică a producerii. De aceea a fost necesar de a se stabili timpul, pe durata căruia tulpinile de bacterii lactice autohtone selectate coagulează laptele. Rezultatele obținute privind determinarea vitezei de fermentare a laptelui de către tulpinile *S. thermophilus* studiate la temperatura de incubare 40°C sunt reprezentate în Tabelul 3.5.

Tabelul 3.5. Viteza de fermentare a laptelui de către tulpinile în studiu

Codul tulpinii	Durata, ore
L 12	5,4±0,2
L 65	3,6±0,1
L 102	4,1±0,2
L 109	5,2±0,2
L 177	4,0±0,2
L 232	6,5±0,3
L 292	7,2±0,2

Analiza datelor din Tabelul 3.4 demonstrează, că tulpinile de *S. thermophilus* L 12, L 65, L 102, L 109, L 117 au manifestat viteză înaltă de acidulare a laptelui. Aceste tulpini răspund cerințelor pentru bacteriile lactice termofile, conform cărora activitatea fermentativă a tulpinilor nu trebuie să depășească 6 ore. Pe când tulpinile L 232 și L 292 au fermentat laptele în 6,5±0,5 ore și 7,0±0,5 ore respectiv, astfel depășind limita rezervată pentru streptococii termofili în fabricarea produselor lactate fermentate [15, 140].

Tulpinile autohtone izolate au fost testate privind *capacitatea de a forma coagul* în lapte (capacitatea de a fermenta) pentru o anumită perioadă de timp. Toate tulpinile studiate au fost capabile să se dezvolte și se formeze coagulul în eprubete cu lapte la temperaturi de incubare de la 42 °C până la 48 °C. Caracteristica această indică adaptarea înaltă a bacteriilor la condițiile nefavorabile și competitivitatea lor în condițiile tehnologice, cum ar fi fabricarea produselor lactate fermentate și perspectiva utilizării lor în compoziția culturilor starter mixte [8].

Prin *acumularea acidului lactic* în laptele fermentat se poate concluziona despre intensitatea dezvoltării bacteriilor lactice într-o anumită perioadă de timp. Rezultatele obținute privind evoluția în timp al acestui parametru sunt reprezentate în Tabelul 3.6.

Tabelul 3.6. Formarea coagulului și acumularea acidului lactic sub acțiunea tulpinilor studiate

Codul tulpinii	Durata de cultivare, ore						
	Aciditatea titrabilă, °T						
	1	2	3	4	5	6	7
L 12	25,7±1,5	32,7±0,6	48,7±1,2	55,3±1,5	68,0±1,0*		
L 65	28,3±1,5	48,7±0,6	60,7±0,6	72,0±1,0*			
L 102	27,6±1,5	42,9±0,6	55,7±0,6	66,0±1,0*			
L 109	26,7±0,6	37,3±0,6	47,7±0,6	63,3±1,2	75,3±1,2*		
L 177	29,7±0,6	41,3±0,6	54,0±1,0	68,0±1,7*			
L 232	24,7±0,6	35,0±1,0	47,6±1,5	60,3±0,6	68,7±1,2	76,0±1,0*	
L 292	26,0±1,0	32,7±1,5	36,7±0,6	47,0±1,0	54,3±1,2	62,3±1,5	69,3±2,0*

*Semnul *indică formarea coagulului*

Analiza datelor din tabelul 3.5 indică, că aciditatea laptelui a crescut în mediu cu 8,7 °T per oră. Este necesar de a remarca, că tulpinile L 102, L 65 și L 177 au efectuat acidularea laptelui rapid cu viteza de 7,6 °T per oră, pe când la cultura L 292 viteza de acumulare al acidului lactic a fost de 8,4 °T per oră.

Aciditatea maximă determinată în laptele coagulat are o mare importanță tehnologică și de acest indicator depind calitatea și condițiile de păstrare a produsului finit.

În continuare a fost studiată aciditatea maxima înregistrată pe parcursul a 7 zile în laptele fermentat de către tulpinile selectate (Tabelul 3.7).

Tabelul 3.7. Aciditatea maximă a laptelui fermentat de către culturile studiate

Codul tulpinii	Zile de cultivare/Aciditatea titrabilă, °T					
	2	3	4	5	6	7
L 12	85,3±0,6	90,3±0,6	109,0±0,0	116,0±1,0	117±1,1	118,3±0,6
L 65	84,3±1,5	91,3±0,6	105,7±0,6	110,7±0,6	112,7±1,1	114,3±0,6
L 102	77,7±0,6	87,6±0,6	101,7±1,1	109,7±1,1	111,3±1,1	110,3±0,6
L 109	90,3±0,5	101,3±0,6	110,3±1,5	119,3±1,1	123,3±1,5	120,0±0,0
L 177	78,3±1,1	91,1±1,0	100,3±1,5	111,0±1,0	110,7±1,1	112,3±0,6
L 232	90,0±1,7	90,0±0,0	106,7±0,7	115,7±1,1	115,3±0,6	117,3±0,6
L 292	92,7±1,5	104,0±2,0	108,0±2,0	123,3±1,1	123,3±1,1	128,7±1,1

Rezultatele din Tabelul 3.6 demonstrează că cel mai înalt nivel al acidogenezei îl posedă tulpina L 292 cu 128,7±1,1°T după 7 zile de incubare, iar cea mai mică – tulpina L102 cu

110,3±0,6 °T după 5 zile de incubare. Rezultatele obținute demonstrează o activitatea proteolitică scăzută a tulpinilor selectate, ceea ce este favorabil pentru utilizarea lor în calitate de culturi starter pentru fabricarea produselor lactate fermentate.

Analiza comparativă a caracteristicilor tehnologice nu indică diferențe semnificative dintre tulpinile studiate [8].

Efectuându-se analizele microbiologice ale probelor de lapte, fermentat cu tulpini de bacterii lactice a fost determinat numărul de microorganisme într-un 1 ml de lapte steril degresat fermentat.

Numărul de microorganisme UFC în 1 ml de lapte fermentat a fost determinat prin diluții zecimale. S-a stabilit că, titrul de microorganisme viabile a fost la nivel 10^{10} UFC în 1 ml de lapte fermentat de tulpinile L 12, L 65, L 102, L 177 și 10^9 UFC·mL⁻¹ în cazul tulpinii L 109, ceea ce reprezintă valori înalte comparativ cu 10^7 UFC·mL⁻¹ pentru tulpina L 232 și 10^6 UFC·mL⁻¹ pentru tulpina L 292, ceea ce este insuficient pentru utilizarea tulpinilor în calitate de culturi starter pentru obținerea produselor lactate [24].

Activitatea fermentativă joasă și titrul insuficient în laptele fermentat, manifestate de către tulpinile L 232 și L 292 caracterizează aceste izolate ca fiind culturi slabe pentru a fi utilizate la fabricarea produselor lactate fermentate și, prin consecință aceste tulpini au fost eliminate din studiile ulterioare.

Bacteriile lactice izolate din lapte sau produsele lactate de fermentare spontană prezintă un mare interes în calitate de potențial conservant alimentar, datorită activității lor antagoniste împotriva multor agenți patogeni alimentari. Principalele bacterii patogene din industria laptelui sunt *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, capabile să supraviețuiască în procesul de fabricare a produselor lactate fermentate. *E. coli* și *S. aureus* din iaurt rezultă din contaminarea post-pasteurizare [77]. De aceea unul din parametrii de bază pentru selectarea bacteriilor lactice de interes biotehnologic este activitatea lor antimicrobiană.

Astfel, în continuare au fost cercetate proprietățile antimicrobiene ale tulpinilor studiate față de microflora patogenă și condiționat patogenă prezentă deseori la fabricare.

Pentru a investiga activitatea antibacteriană a tulpinilor selectate de *S. thermophilus* în calitate de culturi test s-au folosit tulpinile de *S. aureus* ATCC® 25923™ și *E. coli* ATCC® 25922™.

Activitatea antagonistă a streptococilor termofili selectați a fost studiată, utilizându-se metoda de difuzie în agar. Rezultatele cercetărilor privind activitatea antagonista a culturilor de bacterii lactice sunt prezentate în Tabelul 3.8.

Tabelul 3.8. Proprietățile antimicrobiene ale tulpinilor de bacterii lactice studiate

Codul tulpinii	Test-cultura	
	<i>E. coli</i> ATCC® 25922™	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923™
	Diametrul zonei de inhibiție, mm	
L 12	16,0±0,6	17,0±1,0
L 65	18,6±0,6	20,0±0,6
L 102	16,3±0,6	17,0±1,1
L 109	16,0±1,0	20,0±0,6
L 177	15,7±0,5	20,0±0,6

Analizând datele din tabelul 3.8, putem concluziona că activitatea antagonistă împotriva microorganismelor patogene a tulpinilor de *S. thermophilus* este considerabilă [46, 50]. Zona de inhibiție variază între 16 și 18 mm față de *E. coli* și 19-21 mm față de *S. aureus*, ce permite inhibarea dezvoltării infecțiilor intestinale. Aceste rezultate confirmă valoarea tulpinilor autohtone, care s-au dovedit mai active față de tulpinile descrise de alți autori, de ex. tulpina *S. thermophilus* T2 selectată din lapte crud care nu a prezentat nici o activitate inhibitoare împotriva *E. coli* și *S. aureus* [87].

Capacitatea tulpinilor S. thermophilus de a sintetiza exopolizaharide. Capacitatea de a sintetiza EPS la streptococii termofili este considerată o caracteristică biotehnologică importantă, care, pe de o parte, contribuie la îmbunătățirea viscozității și texturii produsului în procesul de fabricare a unor produse lactate fermentate, cum ar fi iaurturile [63], iar pe de altă parte protejează celulele bacteriene de efectele adverse ale factorilor externi, cum ar fi modificările fizice și chimice ale mediului, impactul altor bacterii și al bacteriofagilor etc.

Rezistența streptococilor termofili la temperaturi ridicate, precum și capacitatea de a sintetiza EPS le oferă posibilitatea de a forma biopelicle (biofilme) pe suprafața produselor lactate, care protejează bacteriile lactice în condiții nefavorabile.

Textura produselor lactate fermentate este dependentă în mare măsură de EPS-le sintetizate de bacteriile ce alcătuiesc cultura starter. Multe bacterii lactice termofile sunt capabile să formeze EPS [68]. Capacitatea de a produce EPS depinde de specificul tulpinii și de condițiile de cultivare (compoziția mediului, pH-ul, temperatură, raportul carbon/azot etc.). Utilizarea culturilor producătoare de EPS *S. thermophilus* și *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, în calitate de cultura starter simbiotică pentru fabricarea smântânii fermentate și iaurtului, contribuie la îmbunătățirea texturii și viscozității produsului, prezentând o alternativă pentru stabilizatorii comerciali. EPS contribuie la textura densă a produselor lactate fermentate datorită legării apei libere și duc la încetinirea sinerezei. Acest lucru este deosebit de important la fabricarea produselor cu un conținut redus de grăsime, care își pierd considerabil viscozitatea în timpul fermentării, cum ar fi brânza degresată, deserturile lactate și iaurturile.

Astfel, unul dintre parametrii esențiali pentru evaluarea calității produselor lactate este densitatea și textura coagulului de lapte format. În acest scop au fost selectate tulpini de streptococi lactici termofili capabili să formeze coagulul dens în lapte, fără adaos de agenți de îngroșare. Trebuie remarcat faptul că multe produse lactate se obțin cu utilizarea stabilizatorilor. În acest scop sunt utilizați de regulă agenți de îngroșare naturali, care includ hidrați de carbon de origine vegetală și animală (amidonul, pectina, guarul sau guma xantan, gelatina, extractul de malț), precum și stabilizatori proteici artificiali, care în laptele rece formează o suspensie de particule fine cu capacitate mare de gonflare în procesul de pasteurizare a laptelui.

Utilizarea în calitate de culturi starter a tulpinilor producătoare de EPS din specia *S. thermophilus* face posibilă obținerea unei consistențe mai dense a produselor lactate, fără necesitatea folosirii agenților de îngroșare și stabilizatorilor.

Inițial, tulpinile au fost estimate vizual după lungimea firului filant al coagulului prezentat în Figura 3.9.

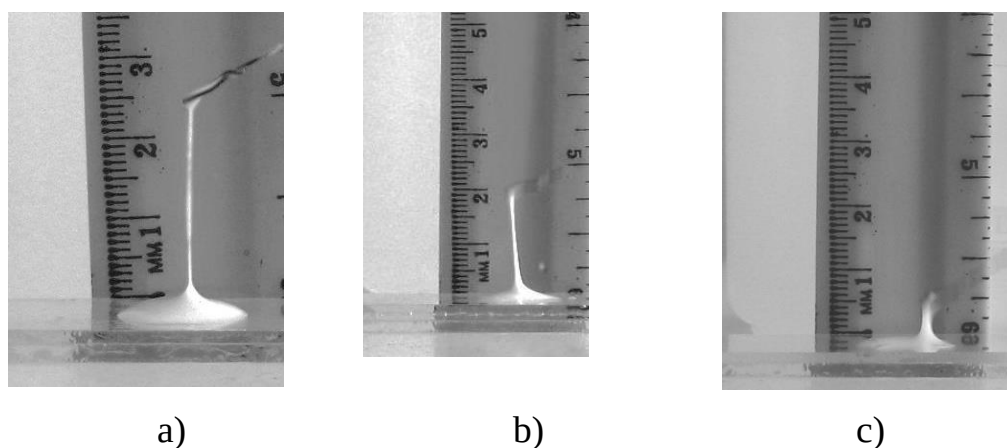


Fig. 3.9. Aprecierea vizuală a firului filant al coagulului format de culturile:

a) L 177; b) L 65; c) L 102 (Autor foto Cartășev A.) [51].

Testarea bacteriilor din punct de vedere a producerii EPS a fost realizată prin metoda de separare a proteinelor din mediul de cultură cu acid tricloracetic și precipitarea polizaharidelor cu etanol. Rezultatele investigațiilor asupra capacității de sinteză a EPS-ilor și proprietăților coagulului format de culturile studiate sunt prezentate în Tabelul 3.10.

Tabelul 3.10. Sinteza EPS și caracteristica coagulului format sub acțiunea bacteriilor lactice

Codul tulpinii	Consistența coagulului format	Cantitatea EPS mg/100 g	Sinereză, cm ³
L 12	cremoasă	0,0	1,3±0,1
L 65	vâscoasă	43,6±1	0,0
L 102	cremoasă	2,4±0,5	0,8±0,1
L 109	cremoasă	0,0	1,7±0,2
L 177	vâscoasă	52,1±1	0,0

Analiza datelor obținute din Tabelul 3.8 demonstrează, că tulpinile studiate formează coagulul cremos sau viscos, cu sau fără eliminarea de zer.

În decursul cercetărilor s-au evidențiat 2 tulpini producătoare de EPS: L 65 și L 177. În cazul tulpinii L 102, cantitatea de EPS sintetizate este mică. Celelalte 2 tulpini nu produc EPS, sau cantitatea lor fiind foarte mică, ele co-precipită cu proteinele la adăugarea acidului tricloracetic și nu mai pot fi detectate la precipitarea cu etanol.

Astfel, din cele 5 tulpini autohtone de bacterii lactice termofile din specia *S. thermophilus* izolate din produse lactate naționale de fermentare spontană au fost identificate 2 tulpini cu activitate înaltă și stabilă de producere a EPS-lor, ce contribuie la formarea unui coagul corespunzător cerințelor tehnice pentru iaurt și care pot servi drept alternativă pentru stabilizatorii utilizați în industria laptelui.

Cercetările efectuate demonstrează posibilitatea de selectare din surse autohtone a tulpinilor de bacterii lactice cu potențial tehnologic natural (nemodificate genetic) și de utilizare a lor la fabricarea produselor lactate sigure pentru consum [9].

În baza investigațiilor efectuate și a rezultatelor obținute, cele mai valoroase tulpini selectate de bacterii din specia *S. thermophilus* au fost depozitate în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene cu atribuirea numerelor de colecție, după cum urmează:

- *Streptococcus thermophilus* L 177 depozitat cu numărul CNMN LB – 50;
- *Streptococcus thermophilus* L 65 depozitat cu numărul CNMN LB – 51;
- *Streptococcus thermophilus* L 12 depozitat cu numărul CNMN LB – 52;
- *Streptococcus thermophilus* L 102 depozitat cu numărul CNMN LB – 53;
- *Streptococcus thermophilus* L 109 depozitat cu numărul CNMN LB – 54.

Adeverințele de depozitare a tulpinilor în CNMN sunt prezentate în Anexa 2.

Tulpinile selectate au constituit obiectul cercetărilor ulterioare, orientate spre determinarea factorilor optimali de sporire a activității lor biotehnologice și de sinteză a componentelor valoroase.

3.6. Sinteza exopolizaharidelor (EPS) de către *Streptococcus thermophilus* în condiții de cultivare periodică

Strategiile tradiționale de majorare a cantității de EPS bacteriene includ selecția tulpinilor producătoare de EPS și optimizarea condițiilor de cultivare. Succesul acestor strategii aplicate în cazul bacteriilor lactice este determinat de limitele fiziologice ale tulpinilor. Din punct de vedere științific și practic este important să se stabilească condițiile optime de cultivare pentru acumularea biomasei, sinteza de EPS și reducerea duratei fazelor de dezvoltare a bacteriilor lactice cu scopul elaborării culturilor starter biotehnologic active.

În publicațiile de specialitate cu referință la bacteriile lactice sunt prezentate informații contradictorii privind dependența sintezei EPS-lor de factorii externi. Se presupune că temperatura de cultivare și sursa de carbon din mediu au o semnificație primordială [61]. Totuși fiecare tulpină reacționează individual la condițiile de cultivare [40].

Sursele bibliografice relatează despre sporirea sintezei EPS-lor extracelulare de către tulpinile de *S. thermophilus* odată cu scăderea temperaturii de cultivare, fapt ce se explică prin rolul protector al capsulei de EPS a bacteriilor lactice în condiții nefavorabile [104, 123].

În continuarea cercetărilor realizate la acest capitol, a fost studiată dinamica multiplicării tulpinilor selectate, evoluția acidității titrabile și sintezei EPS, în condiții de cultivare periodică a tulpinilor selectate în lapte degresat la temperatura de 32 ± 1 °C. Cercetările au fost efectuate în bioreactorul Sartorius Biostat® A plus, (Germania).

Pentru a determina relația dintre schimbarea caracteristicilor efective (aciditatea titrabilă și activă, numărul de bacterii viabile) în dependență de durata de cultivare a tulpinii concrete, a fost realizată analiza de regresie și adoptat modelul polinom ce descrie cel mai adecvat rezultatele experimentelor. Etapele analizei de regresie și construirea intervalului de încredere sunt descrise în compartimentul II al tezei (p. 2.3.40)

La evaluarea evoluției acidității titrabile în funcție de durata de cultivare, s-a presupus că sistemul biologic cu utilizarea tulpinilor *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și CNMN-LB-51 funcționează proporțional cubului (x^3).

În rezultatul multiplicării tulpinii *S. thermophilus* CNMN-LB-50 aciditatea activă a atins valoarea pH 4,5 la $14,0 \pm 0,5$ ore de cultivare.

Rezultatele evoluției acidității titrabile în funcție de timpul de cultivare sunt reprezentate în Figura 3.10.

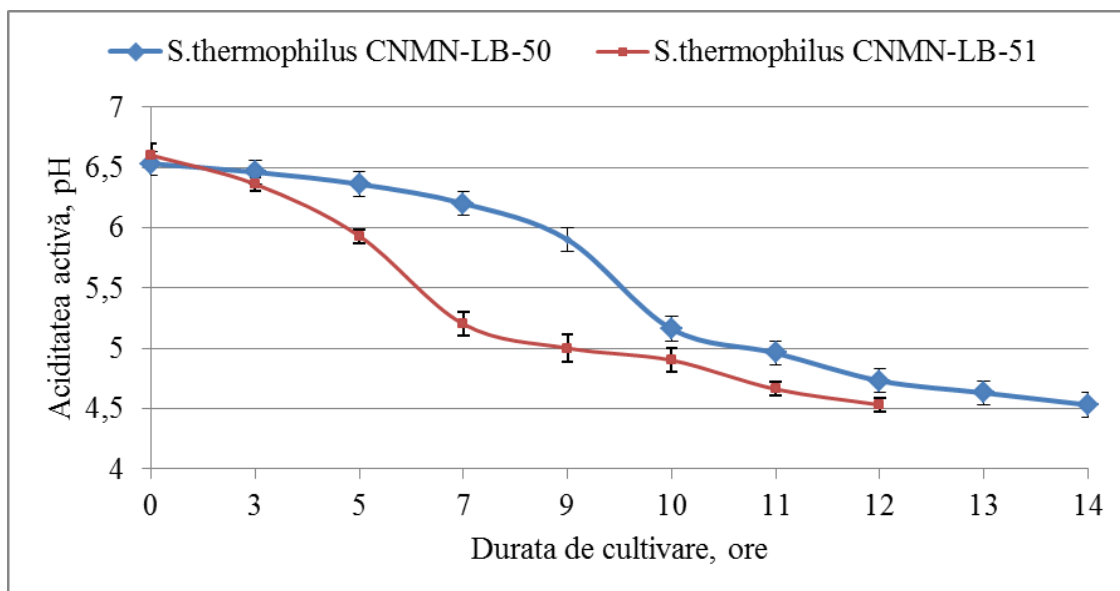


Fig. 3.10. Modificarea acidității titrabile în procesul de cultivare a tulpinilor de *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și CNMN-LB-51 în lapte la temperatura de 32 ± 1 °C.

Datele obținute arată că în primele $10 \pm 0,5$ ore de cultivare a tulpinilor de *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și CNMN-LB-51 se observă modificări mai puțin intense de aciditate. Acest lucru se datorează, probabil, conținutului sărurilor de tampon în mediul. Apoi are loc o scădere lentă a pH-ului. Astfel, pentru primele $10 \pm 0,5$ ore Δ pH al tulpinii *S. thermophilus* CNMN-LB-50 a fost 0,9 unități iar după $14 \pm 0,5$ ore de cultivare – 1,1 unități, ceea ce indică o creștere a acumulării acidului lactic prin dezvoltarea mai intensă a bacteriilor lactice.

Cât privește evoluția acidității, provocată de tulpina *S. thermophilus* CNMN-LB-51 la temperatura de cultivare 32 ± 1 °C, atingerea nivelului pH 4,5 a avut loc în 12 ore. În primele $5 \pm 0,5$ ore de cultivare în lapte degresat Δ pH scade brusc cu 0,6 unități, iar apoi are loc o acumulare intensivă a acidului lactic – 1,4 unități în doar 7 ore de cultivare.

Cu scopul descrierii mai exacte și prognozării procesului de acidogeneză a fost realizată prelucrarea matematică a datelor obținute privind capacitatea culturilor de a produce acid lactic și obținute ecuațiile de regresie de ordinul al treilea, care descriu adecvat dependența acidității active de durata cultivării.

Figura 3.11 prezintă datele dinamicii dezvoltării tulpinilor *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și CNMN-LB-51 și acumulării biomasei în mediul lapte degresat la temperatura 32 ± 1 °C.

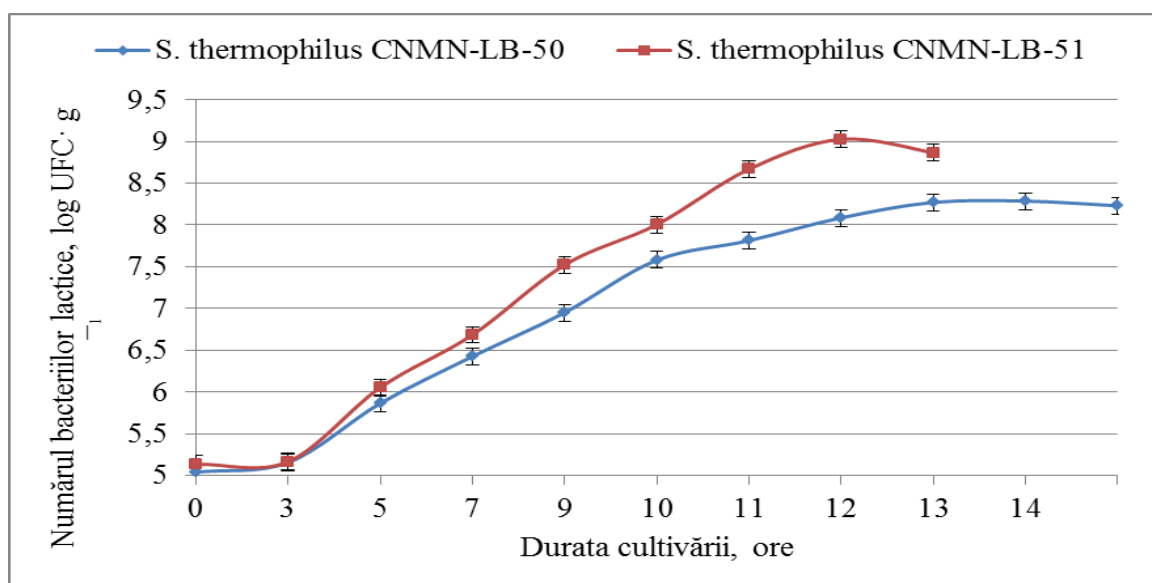


Fig. 3.11. Cinetica multiplicării tulpinilor autohtone producătoare de EPS din specia *S. thermophilus* la 32°C.

După 12±0,5 ore se observă sfârșitul fazei de creștere logaritmică și începe faza staționară la tulpina *S. thermophilus* CNMN-LB-50, iar după 10±0,5 ore la tulpina *S. thermophilus* CNMN-LB-51.

La cultivarea tulpinii *S. thermophilus* CNMN-LB-50 în lapte degresat s-a evidențiat faza multiplicării exponențiale și faza de declin. A fost important însă de a se găsi punctele, în care poate fi așteptat maximumul absolut al funcției - numărul de celule în timpul cultivării, în zonă cercetate Extremele obținute după modelele matematice sunt relativ apropiate, și coincid aproximativ cu extremele obținute în cadrul experimentului, ceea ce confirmă exactitatea experimentului efectuat .

Cantitatea maximală de EPS sintetizate de tulpinile selectate în lapte degresat la temperatura 32 °C a constituit 82,6 mg/100g după 12±0,5 ore pentru *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și 71,7 mg/100g după 10±0,5 ore de cultivare pentru *S. thermophilus* CNMN-LB-51 și a coincis cu faza de creștere logaritmică (Figura 3.12).

Ulterior a fost înregistrată o scădere a cantității de EPS cauzată de majorarea numărului de celule și concentrației enzimelor care distrug EPS-le. Aceste date vin în susținerea ipotezei că la cultivarea îndelungată a tulpinilor de bacterii lactice deseori are loc micșorarea sintezei sau distrugerea EPS-ilor, cel mai probabil sub acțiunea glicohidrolazelor [89].

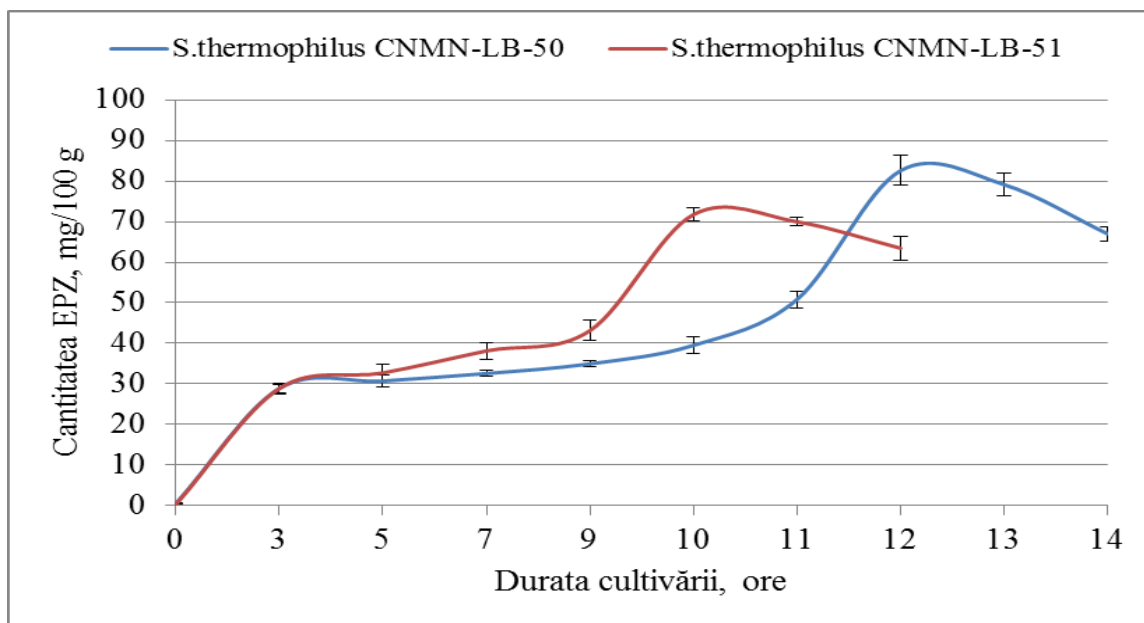


Fig. 3.12. Acumularea EPS-ilor sintetizate de *S. thermophilus* cultivate la 32°C.

În continuare a fost studiată dinamica multiplicării, evoluția acidității și sintezei EPS la cultivarea tulpinilor la temperatura de 40 ± 1 °C, temperatura cel mai frecvent utilizată la fabricarea produselor lactate în condiții industriale.

În baza rezultatelor experimentale a fost efectuată o analiza regresională și adoptat modelul polinomial de gradul a treilea și al patrulea (pentru numărul de celule bacteriene) care cel mai adecvat reflecta rezultatele experimentului. Prin urmare, putem presupune că sistemele biologice cu utilizarea tulpinilor de *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și CNMN-LB-51 variază în mod proporțional la puterea a treia sau la puterea a patra (pentru numărul de celule) în funcție de timpul cultivării.

Rezultatele dinamicii acidității titrabile și ale acidității active în funcție de timpul de cultivare sunt reprezentate în fig. 3.13 și 3.14.

Astfel, tulpinile cercetate au atins aciditatea maximă în $6 \pm 0,5$ ore, ceea ce este caracteristic pentru tulpinile din specia *S. thermophilus* și se încadrează în normele tehnologice. Aciditatea titrabilă la cultivare în lapte degresat la temperatura 40 °C a tulpinilor *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și CNMN-LB-51 a atins valori de 73 ± 2 °T și 70 ± 2 °T respectiv, ceea ce este caracteristic speciei (normele indică aciditatea între 67-79 °T) [24]. Datele obținute arată că aciditatea tulpinilor este moderată, indicând o activitate biochimică suficientă a acestor tulpini.

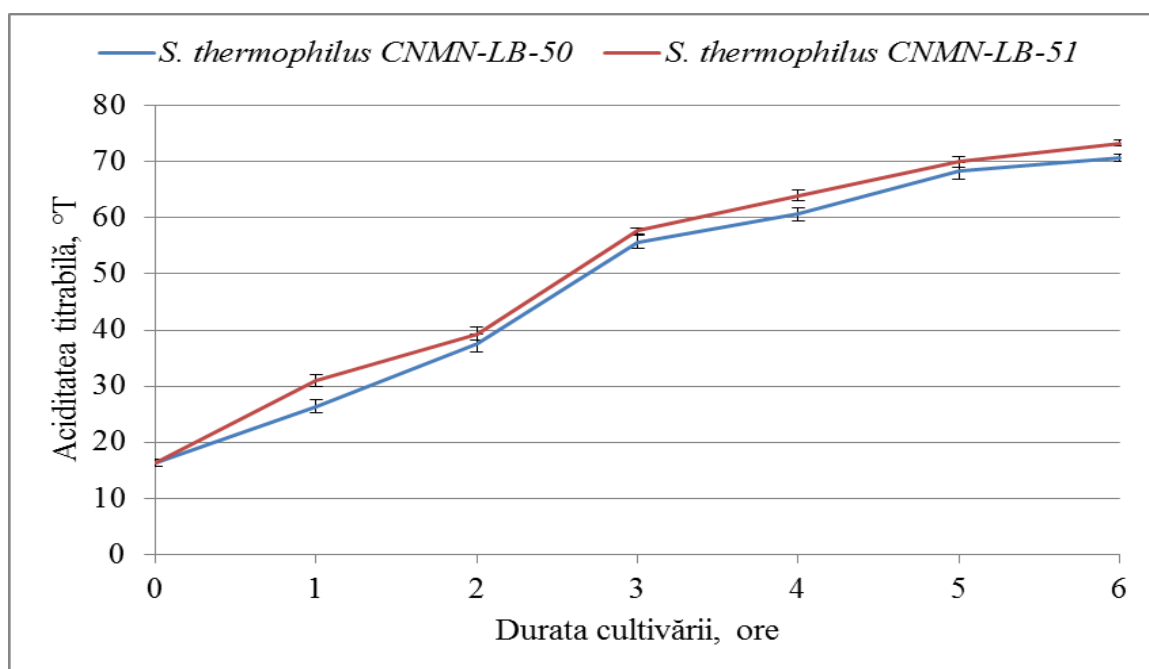


Fig. 3.13. Dinamica acidității titrabile pe parcursul cultivării tulpinilor la temperatura $40\pm 1^{\circ}\text{C}$.

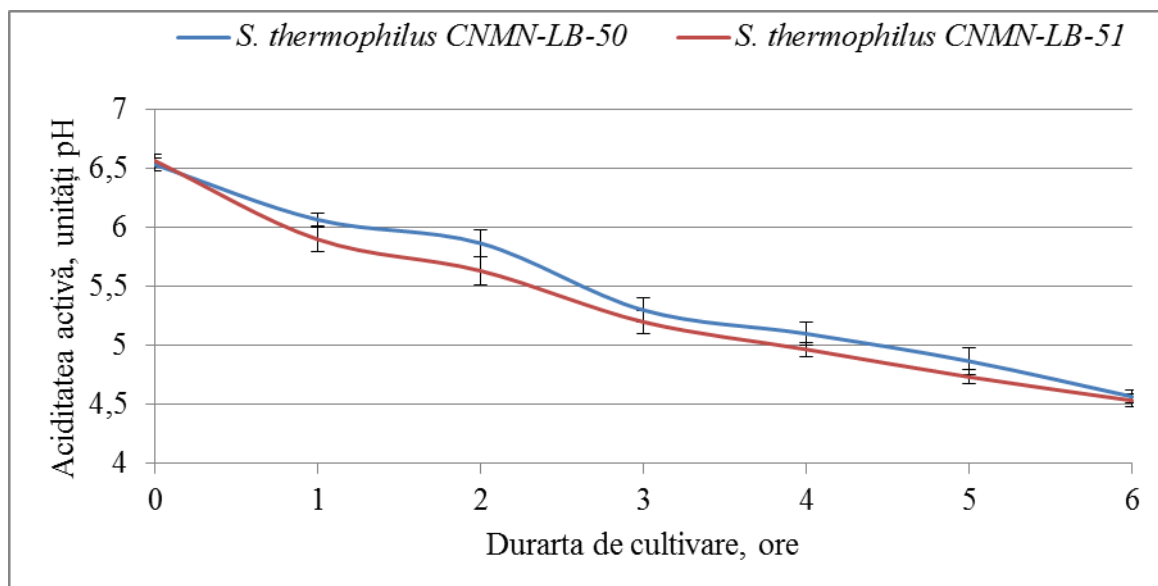


Fig. 3.14. Schimbarea acidității active în timpul cultivării la temperatura de $40\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Valoarea pH-ului la cultivarea tulpinilor la temperatura de $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ în lapte degresat după $6\pm 0,5$ ore s-a micșorat cu 1,9 unități pentru tulpina *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și cu 2,0 unități pentru *S. thermophilus* CNMN-LB-51. Valorile practic egale demonstrează că ambele tulpini sunt active la parametrul acidogeneză. Trebuie remarcat faptul, că după $14\pm 0,5$ și respectiv $12\pm 0,5$ ore de cultivare diferența valorilor acidității active la fel a fost aproape identică.

Exactitatea experimentului a fost confirmată prin compararea modelelor matematice cu cele experimentale.

Paralel cu aciditatea a fost monitorizat și titrul bacteriilor lactice în decursul fermentării laptelui. S-a constatat că ambele tulpini de bacterii lactice producătoare de EPS cultivate la temperatura de $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ ating faza staționară după $5\pm 0,5$ ore de dezvoltare. Dinamica acumulării masei bacteriene de către tulpinile cercetate este reprezentată în Figura 3.15.

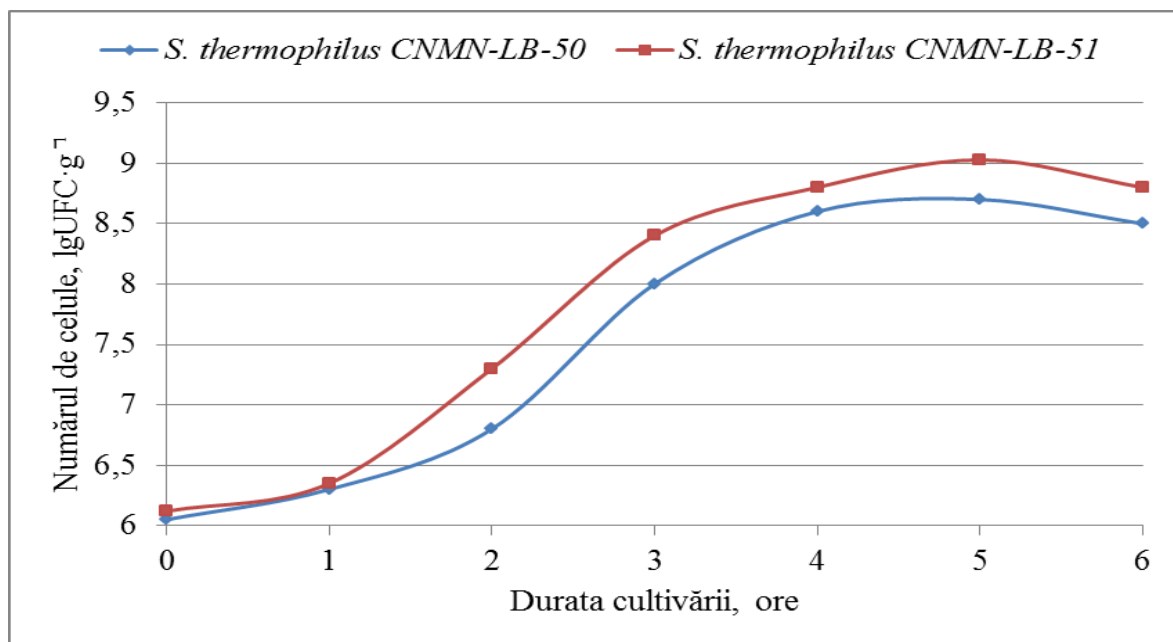


Fig. 3.15. Dezvoltarea tulpinilor *S. thermophilus* la temperatura de cultivare $40\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Din rezultatele respective se observă, că după $4\pm 0,5$ ore de cultivare în lapte degresat ambele tulpini ating concentrația 10^9 UFCmL⁻¹, ceea ce denotă că tulpinile la această temperatură ating rapid valori foarte înalte ale numărului de bacterii viabile.

Unii cercetători au constatat, că conținutul înalt de glucide în lapte stimulează formarea EPS-lor la tulpinile *S. thermophilus* [107, 108, 129]. În experiențele noastre de asemenea am ales calea suplinirii laptelui cu sursă adăugătoare de carbon.

În general, tulpinile de *S. thermophilus* nu au capacitatea de a fermenta un număr mare de zaharuri, spre deosebire de alte bacterii lactice. Sursele de carbon preferate pe care majoritatea tulpinilor de *S. thermophilus* sunt capabile să le utilizeze sunt: glucoza, lactoza, zaharoza și fructoză. Glucoza și fructoza sunt surse de carbon relativ sărace, rata de creștere a *S. thermophilus* în prezența lor fiind de câteva ori mai mică decât în prezența lactozei sau zaharozei. Zaharoza fosfoenolpiruvat-dependentă a sistemului fosfotransferaza (SFT) catalizează transportul și fosforilarea concomitentă a carbohidraților. Acest sistem reprezintă calea principală de fermentare a zahărului la bacteriile lactice. Din lactoză și zaharoză, numai zaharoză poate fi preluată prin SFT, ceea ce poate contribui la producția înaltă de EPS în cazul utilizării zaharozei în calitate de sursă de carbon [58].

În industria laptelui, la fabricarea iaurtului zaharoza se utilizează în calitate de îndulcitor, care se adaugă în cantitate de 5-8% la sfârșitul procesului de fermentare a laptelui.

Reieșind din cele relatate, pentru a stimula sinteza EPS-lor, în calitate de sursă suplimentară de carbon la mediul de lapte hidrolizat pentru cultivarea *S. thermophilus* a fost introdusă zaharoza în cantitate de 8% .

În rezultatul cercetărilor s-a determinat, că cantitatea maximală de EPS sintetizate după $4 \pm 0,5$ ore de cultivare la sfârșitul fazei exponențiale de dezvoltare a constituit 66,6 mg/100ml pentru *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și 54,7 mg/100ml pentru *S. thermophilus* CNMN-LB-51. Ulterior, la fel ca și în cazul cultivării la temperatura de 32 °C, a avut loc diminuarea cantității de EPS (Figura 3.16).

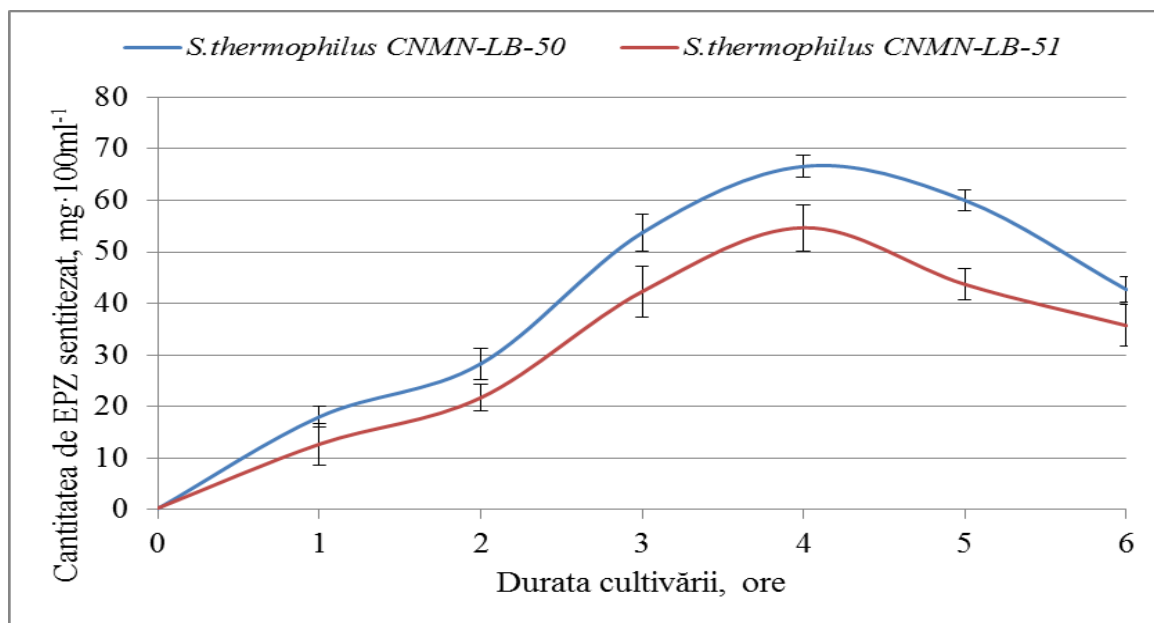


Fig. 3.16. Acumularea EPS-lor de către tulpinile *S. thermophilus* cultivate la temperatură $40 \pm 1^\circ\text{C}$.

Astfel, pentru tulpinile studiate, s-a stabilit producerea cantităților maxime de EPS la sfârșitul fazei exponențiale de dezvoltare, care în cazul cultivării la temperatura de 32 °C are o durată de $12 \pm 0,5$ ore pentru *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și $10 \pm 0,5$ ore pentru *S. thermophilus* L 65, iar în cazul cultivării la temperatura de 42 °C - de $4 \pm 0,5$ ore pentru ambele tulpini.

Dependența numărului de celule viabile și a cantității de EPS de durata cultivării sunt prezentate sub formă de diagramă de suprafață în Figura 3.17.

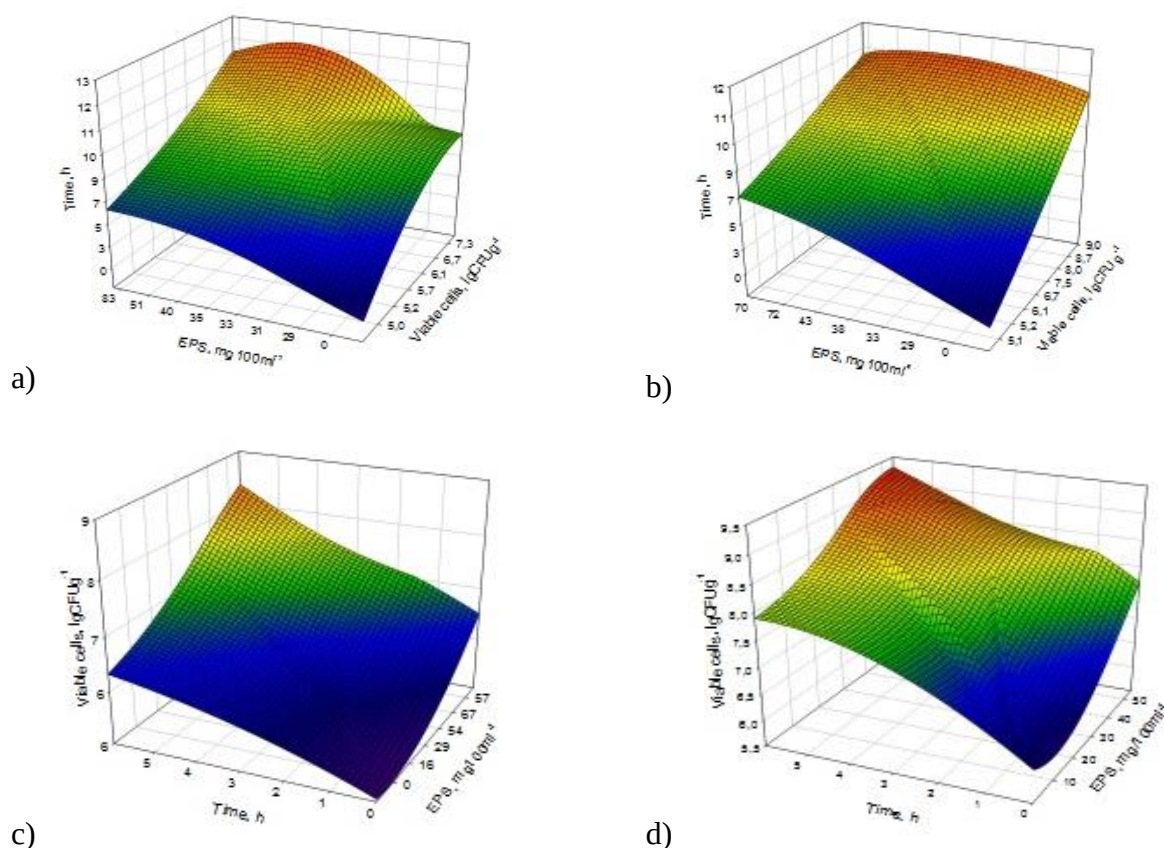


Fig. 3.17. Dependența numărului de bacterii lactice viabile și a cantității de EPS în funcție de durata cultivării la temperatura de $32\pm 1^\circ\text{C}$ (a,b) și $40\pm 1^\circ\text{C}$ (c,d): a, c) *S. thermophilus* CNMN-LB-50; b, d) *S. thermophilus* CNMN-LB-51.

Relația dintre numărul de celule vii și sinteza EPS-lor este foarte complexă și depinde de metabolismul surselor de carbon în direcția glicolizei sau sintezei EPS-lor în diverse condiții.

Diagramele reprezentate în Figura 3.17 arată în mod clar că valoarea maximă a EPS-lor sintetizate la temperatura suboptimală (32°C) a fost mai mare decât la temperatură optimă (40°C), reprezentând 19,4% pentru tulpină *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și 23,8 % pentru *S. thermophilus* CNMN-LB-51. Astfel, s-a demonstrat că modificarea temperaturii de cultivare influențează durata fazelor de dezvoltare și randamentul producerii metaboliților extracelulari la tulpinile de bacterii lactice *S. thermophilus* L 65 și *S. thermophilus* L 177.

Astfel, au fost stabiliți experimental parametrii biotehnologici optimi pentru culturile de bacterii lactice producătoare de EPS, ce se caracterizează prin randament înalt a EPS-lor și numărul mare de celule viabile. În condiții industriale de fabricare a produselor lactate fermentate, pentru a stimula sinteza EPS-lor, mediul nutritiv poate și suplimentat cu zaharoză în cantitate de 8%, fără a modifica temperatura. În condiții industriale tulpinile autohtone de *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și CNMN-LB-51 produc cantități suficiente de EPS pentru îmbunătățirea calității produselor lactate, ce permite excluderea substanțelor stabilizatoare din procesul tehnologic [141].

3.7. Concluzii la capitolul 3

1. În rezultatul efectuării cercetărilor expuse în capitolul 3 a fost demonstrată posibilitatea de obținere din microflora laptelui crud și a produselor lactate de fermentare spontană a tulpinilor autohtone de bacterii lactice cu proprietăți biotehnologice valoroase, destinate utilizării în compoziția culturilor starter cu scopul fabricării produselor lactate fermentate [4, 5, 6].
2. Tulpinile selectate de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* se caracterizează prin activitate intensă de acidulare a laptelui, timp de 3-4 ore dezvoltându-se o aciditate a laptelui la nivelul de 65 - 74 °T, formând un coagul omogen, compact, dens, ce asigură consistența fermă a acestuia. Tulpinile *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și CNMN-LB-51 sunt capabile să sintetizeze EPS.
3. Activitatea antagonistă împotriva microorganismelor patogene a tulpinilor autohtone de *S. thermophilus* este înaltă. Zona de inhibiție variază între 16 și 18 mm față de *Escherichia coli*. și 19-21 mm față de *Staphylococcus aureus*, ceea ce permite inhibarea dezvoltării infecțiilor intestinale și previne dezvoltarea patogenelor în probele lactate fermentate.
4. Valoarea maximală a EPS-urilor sintetizate la temperatura suboptimală de 32 °C este mai mare cu 19,4% , decât la temperatura optimală pentru acest proces (40°C), pentru tulpina *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și cu 23,8 % pentru tulpina *S. thermophilus* CNMN-LB-51. Modificarea temperaturii de cultivare influențează durata fazelor de dezvoltare și randamentul producerii metaboliților extracelulari de către aceste tulpini.
5. Experimental au fost stabiliți parametri biotehnologici optimi ai culturilor de bacterii lactice producătoare de EPS, care asigură un randament înalt de obținere a EPS-urilor și unui număr mare de celule viabile. Pentru a stimula sinteza de EPS în condiții industriale la fabricarea produselor lactate fermentate fără a modifica temperatura, mediul nutritiv trebuie suplimentat cu zaharoză în cantitate de 8%. În condiții industriale tulpinile autohtone de *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și CNMN-LB-51 produc cantități suficiente de EPS pentru îmbunătățirea calității produselor lactate, ceea ce permite excluderea substanțelor stabilizatoare din procesul tehnologic [132].

4. APLICAREA TULPINILOR SELECTATE DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* ÎN COMPOZIȚIA CULTURILOR STARTER

Tehnologia de fabricare a produselor lactate acide presupune fermentarea laptelui cu utilizarea culturilor pure sau a consorțiilor bacteriene compuse din diferite tulpini de bacterii lactice. În acest caz, este important ca tulpinile utilizate în compoziția culturilor starter să fie biocompatibile și să asigure un număr de celule microbiene viabile de $10^8 - 10^9$ în 1cm^3 (g). La fabricarea produselor lactate fermentate se recomandă aplicarea tulpinilor producătoare de EPS în culturi starter, care asigură caracteristici organoleptice și reologice necesare produselor finite fără utilizarea aditivilor alimentari.

Este cunoscut faptul, că culturile starter multiple, în comparație cu monoculturile, posedă o activitate biochimică mai mare și o rezistență mai înaltă la diferiți factori negativi, oferind produselor obținute proprietăți probiotice complet noi [143].

De aceea tulpinile autohtone de *S. thermophilus* au fost în continuare incluse în asociații simbiotice, destinate fermentării produselor lactate.

Rezultatele cercetărilor efectuate și descrise la Capitolul 3 al lucrării de față au stat la baza elaborării tehnologiei de fabricare a culturilor starter liofilizate de bacterii lactice, care este descrisă în Instrucțiunea tehnologică privind fabricarea culturilor bacteriene liofilizate pentru produsele lactate fermentate (anexa 5) conform SM 307 „Culturile bacteriene liofilizate pentru produsele lactate fermentate”.

În vederea elaborării acestei tehnologii, au fost parcurse următoarele etape:

1. Optimizarea mediului de protecție pentru liofilizarea tulpinilor de *S. thermophilus*.
2. Elaborarea asociațiilor simbiotice de bacterii lactice termofile autohtone pentru fabricarea iaurtului.
3. Includerea culturilor starter elaborate în procesul tehnologic de fabricare a iaurtului.
4. Determinarea termenului de valabilitate a iaurtului fermentat cu aplicarea culturilor starter autohtone.
5. Studiul de fezabilitate economică a utilizării culturilor starter autohtone în procesul tehnologic de preparare a produselor lactate fermentate.

4.1 Optimizarea mediului de protecție pentru liofilizarea biomasei tulpinilor de *Streptococcus thermophilus*

Utilizarea la scară industrială a microorganismelor, în calitate de agenți biotehnologici pentru fabricarea produselor lactate, impune o conservare adecvată a tulpinilor, ceea ce ar asigura menținerea viabilității, stabilității genetice, purității și capacității lor bioproductive.

Pentru liofilizarea culturilor de bacterii lactice selectate a fost utilizată stația pilot a laboratorului de Biotehnologii alimentare a IȘPHTA formată din: bioreactorul Biostat Sartorius Aplus, centrifuga cu răcire Rotina 38R și sistemul de liofilizare LABCONCO.

Acumularea biomasei culturilor bacteriene înainte de liofilizare s-a efectuat la temperatura 37 °C până la atingerea valorii pH =4,6 a mediului de lapte hidrolizat, pornind de la un inocul inițial de 3%. Ulterior biomasa a fost separată de mediul de cultură prin centrifugare și suspendată în raport 1:1 în mediul de protecție cu următoarea componență: lapte steril degresat (16% SUD), zaharoză (10%), gelatină (5%), glutamat de sodiu (2,5%), citrat de sodiu (5%) [131]. Suspensia obținută a fost repartizată câte 2 ml în flacoane și liofilizată la regimul elaborat de Laboratorul de Biotehnologii Alimentare.

În rezultatul liofilizării a fost testată viabilitatea culturilor selectate și s-a constatat că acest parametru scade comparativ cu titrul bacteriilor înainte de liofilizare de la 10^{11} UFC·g⁻¹ până la 10^9 - 10^8 UFC·g⁻¹.

În acest context, a apărut necesitatea optimizării mediului de protecție pentru păstrarea sigură a tulpinilor de bacterii lactice. La selectarea componentelor mediului de liofilizare s-a ținut cont de datele din literatura de specialitate, conform cărora utilizarea lioprotectorilor permeabili, în absența celor impermeabili, este inefficientă și că utilizarea mediilor de protecție cu compoziție complexă are efect pozitiv asupra menținerii viabilității materialului biologic [41].

Prin urmare, în calitate de crioprotectori în componența mediilor de protecție pentru conservarea tulpinilor *S. thermophilus*, au fost utilizați: glicerolul și citratul de sodiu - lioprotectori permeabili, gelatina și zaharoza –impermeabili, în soluția tampon de fosfați K₂HPO₄ și KH₂PO₄ cu pH 7,2.

Raportul optim al componentelor mediului protector compus din lapte degresat, glicerol, zaharoză, citrat de sodiu și gelatină a fost determinat cu aplicarea metodei de planificare matematică a experiențelor. În condiții de laborator (Direcția „Tehnologii Alimentare”, IP IȘPHTA) au fost fabricate 24 mostre experimentale de tulpini liofilizate în corespundere cu matricea de planificare a experimentului factorial cu 4 factori (Tabelul 2.3, Capitolul 2). După evaluarea numărului de celule viabile în fiecare din variantele experimentale, a fost alcătuită ecuația de regresie (4.1) care descrie veridic ($p < 0,05$) în valori naturale modificarea viabilității bacteriilor lactice în funcție de conținutul substanțelor de protecție în mediul de liofilizare.

Astfel ecuația de regresie obținută ($R^2=99,9\%$) este următoarea:

$$Y=56,83-0,25Gl+2,06Z+0,17CS+0,02G \quad (4.1)$$

unde:

Y – viabilitatea bacteriilor, %;

Gl – conținutul de glicerină, %

Z – conținutul de zaharoză, %

CS – conținutul de citrat de sodiu, %

G – conținutul de gelatină, %

Conform valorilor și semnelor coeficienților de regresie din ecuația 4.1, putem concluziona că zaharoza, glicerolul și citratul de sodiu influențează esențial viabilitatea bacteriilor lactice liofilizate, pe când efectul gelatinei este neesențial.

Vizualizarea grafică a ecuației de regresie polinomice 4.1 este prezentată în Figura 4.1.

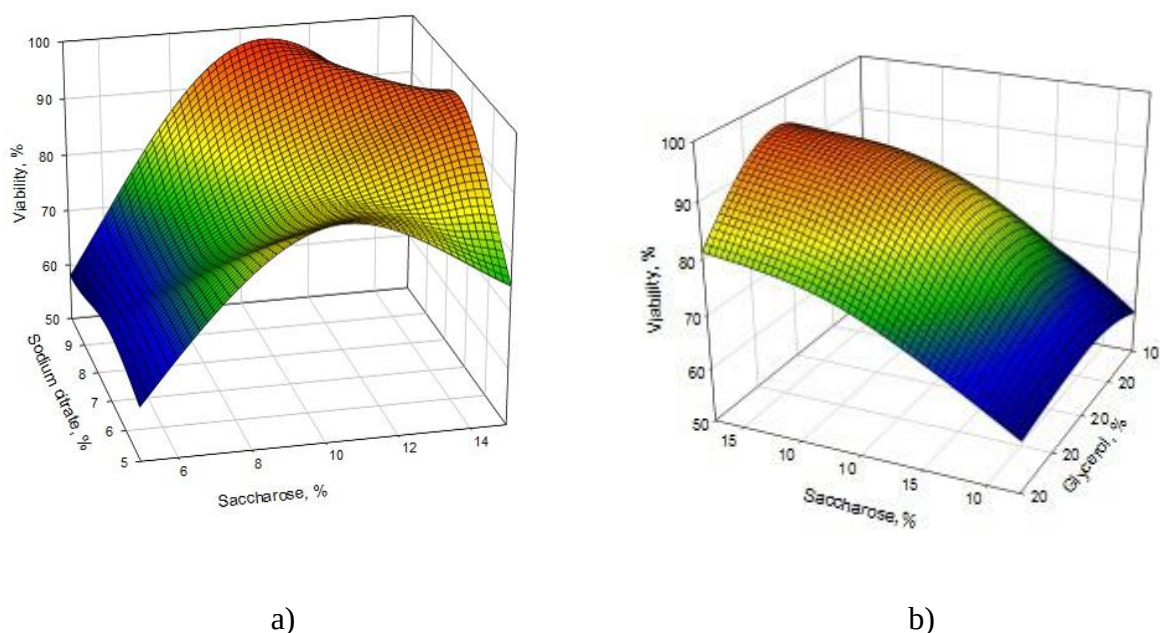


Fig. 4.1. Reprezentarea grafică a modelului matematic de viabilitate a bacteriilor lactice din specia *S. thermophilus* după liofilizare în mediul protector compus: a) viabilitatea în funcție de zaharoză și citrat de sodiu; b) viabilitatea în funcție de zaharoză și glicerol.

Analiza detaliată a ecuației 4.1 ne permite să afirmăm, că zaharoza și citratul de sodiu au o influență semnificativă asupra viabilității culturilor de *S. thermophilus*, ceea ce contribuie și la păstrarea proprietăților lor biotehnologice importante [48].

În rezultatul cercetărilor efectuate s-a stabilit componența optimă a mediului protector: glicerină – 20%, zaharoză - 10-15%, citrat de sodiu – 7,5-10%, gelatină – 5%, adăugate la lapte degresat cu 16% de substanțe uscate.

Aplicarea practică a modelului matematic obținut (ecuația 4.1) a permis determinarea raportului optim de substanțe protectoare pentru fabricarea concentratelor bacteriene în diapazonul declarat al conținutului de zaharoză, glicerol și citrat de sodiu în mediul protector [11].

În baza rezultatelor cercetărilor privind optimizarea mediului de protecție pentru liofilizarea biomasei tulpinilor *S. thermophilus* a fost depusă cererea de brevet de invenție de

scurtă durată S.2017 0090 din 2017.08.07 "Procedeul de obținere a concentratului bacterian uscat pentru fabricarea produselor lactate fermentate" (Anexa 4).

Tulpinile autohtone de interes biotehnologic au fost liofilizate și pe parcursul a 6 luni de păstrare au fost monitorizate proprietățile lor tehnologice.

Proprietățile biotehnologice ale tulpinilor autohtone de S. thermophilus pe parcursul păstrării în stare liofilizată:

La baza tehnologiei de fabricare a produselor lactate acide stau procese biotehnologice care influențează caracteristicile senzoriale, consistența, valoarea nutritivă și biologică a produsului. O caracteristică importantă ale culturilor starter prezintă păstrarea proprietăților biotehnologice pe durata păstrării lor. Astfel, au fost monitorizate proprietățile biotehnologice principale: activitatea fermentativă, aciditatea activă, viscozitatea relativă, activitatea de acidulare și conținutul exopolizaharidelor la tulpinile selectate *S. thermophilus* CNMN-LB-50, CNMN-LB-51, CNMN-LB-52, CNMN-LB-53, CNMN-LB-54 pe durata păstrării în stare liofilizată timp de 6 luni.

Deoarece pe durata păstrării îndelungate acești parametri se micșorează, una din sarcinile principale este menținerea proprietăților tehnologice în timpul depozitării. Aciditatea activă, viscozitatea relativă și cantitatea exopolizaharidelor au fost determinate înainte și după liofilizare, precum și lunar timp de 6 luni de depozitare. În calitate de probă martor a servit valoarea pH-ului tulpinilor înainte de procesul de liofilizare.

Dinamica acidității active a tulpinilor autohtone *S. thermophilus*, pe durata păstrării timp de 6 luni este prezentată în Figura 4.2.

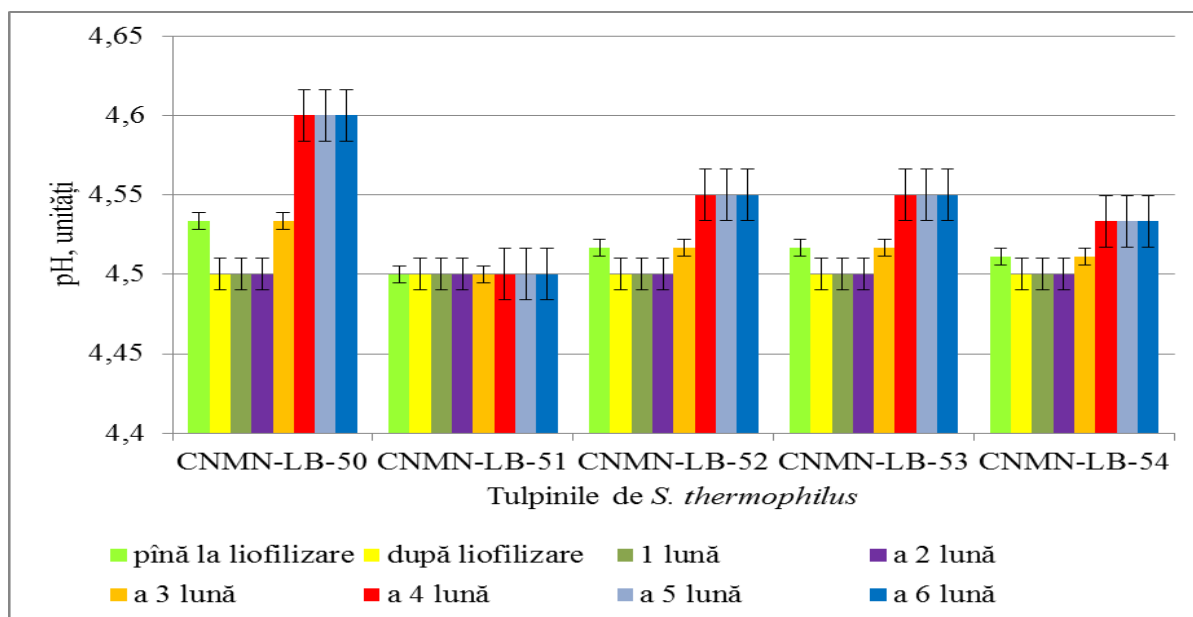


Fig. 4.2. Variația acidității active după uscarea tulpinilor de *S. thermophilus* în timpul depozitării timp de 6 luni

Rezultatele au demonstrat că aciditatea activă produsă în urma fermentării laptelui de către tulpinile studiate a crescut după 6 luni de depozitare de la 4,5 până la 4,6 unități pH, ceea ce se încadrează în normele stabilite în SM 308:2012 "Concentrate bacteriene liofilizate destinate fabricării produselor lactate fermentate". În calitate de martor a servit viscozitatea relativă a coagulului înainte de liofilizare pentru fiecare tulpină.

Schimbarea viscozității relative a probelor de lapte fermentat de către tulpinile studiate este reprezentată în Figura 4.3.

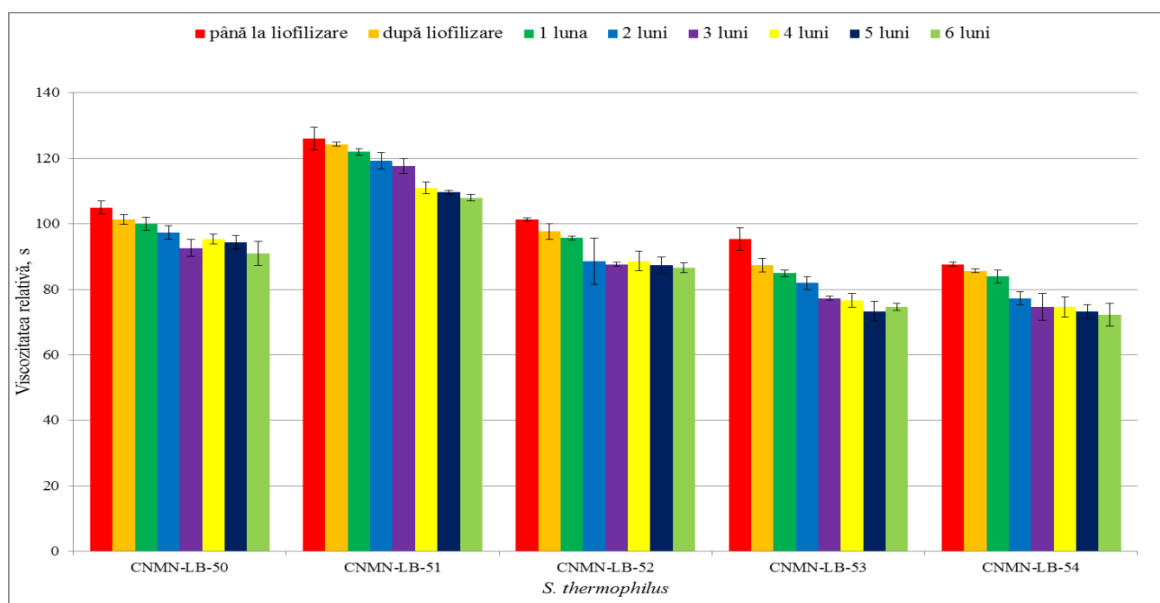


Fig. 4.3. Schimbarea viscozității relative a tulpinilor de *S. thermophilus* la păstrare în stare liofilizată timp de 6 luni.

În rezultatul cercetărilor s-a constatat o scădere a viscozității coagulului fermentat la toate 5 tulpini de *S. thermophilus*: cu 13% pentru *S. thermophilus* CNMN-LB-50; 14% - *S. thermophilus* CNMN-LB-51 și *S. thermophilus* CNMN-LB-52; 17% pentru *S. thermophilus* CNMN-LB-54 și 21% pentru și *S. thermophilus* CNMN-LB-53.

Modificarea conținutului exopolizaharidelor în probele fermentate de tulpinile autohtone de *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și CNMN-LB-51 în perioada depozitării timp de 6 luni în stare liofilizată este reprezentată în Figura 4.4.

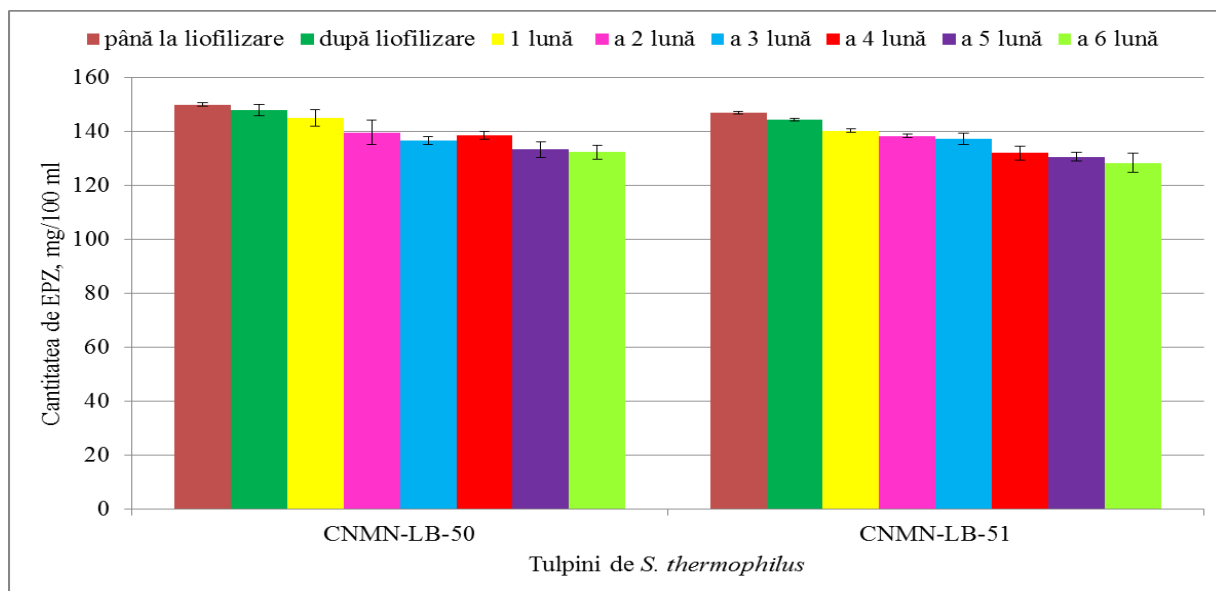


Fig. 4.4. Dinamica cantității EPS-lor a tulpinilor de *S. thermophilus* după liofilizare și în perioada depozitării timp de 6 luni.

Conținutul de EPS în probele de lapte fermentat cu conținut de tulpini de *S. thermophilus* pe parcursul a 6 luni de depozitare a fost comparat cu conținutul de EPS până la liofilizare.

Rezultatele experimentale au demonstrat o scădere a conținutului EPS-lor în comparație cu conținutul inițial al acestora până la liofilizare. Astfel, conținutul de EPS la *S. thermophilus* CNMN-LB-50, după depozitare timp de 6 luni a scăzut cu 11,7%, iar la *S. thermophilus* CNMN-LB-51 - cu 12,7% .

Analiza rezultatelor privind proprietățile tehnologice – aciditatea activă, viscozitatea relativă, cantitatea EPS-lor în coagul a demonstrat că aceste proprietăți în timpul depozitării au avut tendința să se micșoreze. În același timp aceste schimbări nu au fost cruciale și s-au încadrat în limitele admise.

Pentru a restabili proprietățile tulpinilor de *S. thermophilus* după liofilizare, au fost efectuate 3 pasaje ale culturilor în lapte sterilizat degresat, după care din nou au fost evaluate aciditatea activă, viscozitatea relativă și cantitatea de EPS.

Analiza valorilor de aciditate activă după fiecare pasaj, a demonstrat revenirea acestui indicator la valori egale cu cele de înainte de liofilizare după efectuarea a 3 pasaje. Rezultatele sunt reprezentate în Figura 4.5.

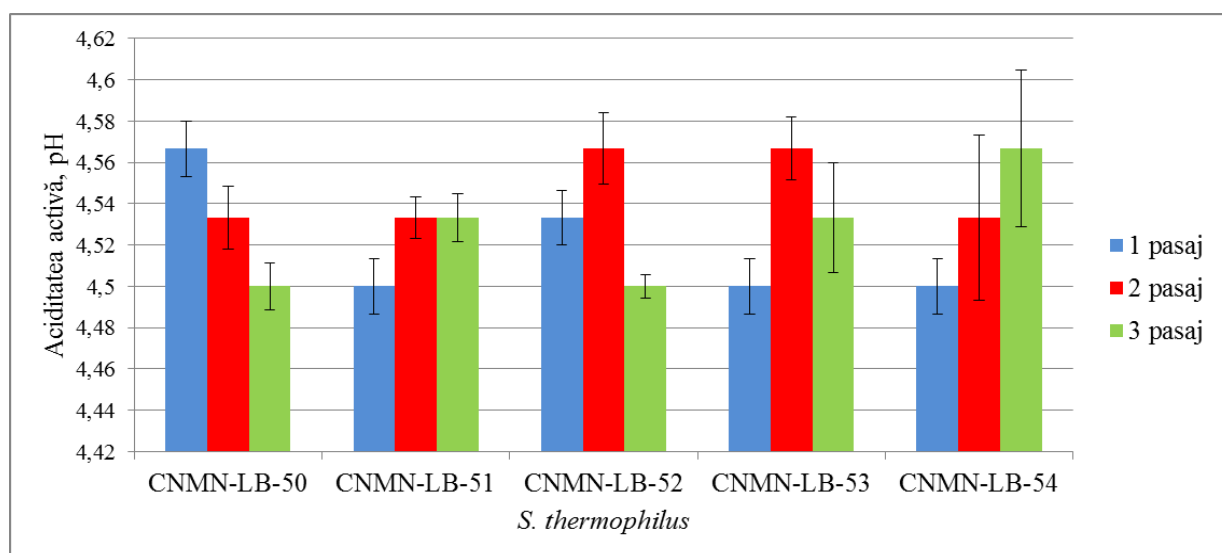


Fig. 4.5. Modificarea acidității active a laptelui fermentat cu *S. thermophilus* cultivate timp de 6 ore.

Ca urmare a reînsămânțărilor triple ale culturilor studiate a fost remarcată restabilirea indicilor de vîscozitate și atingerea valorilor inițiale de până la liofilizare (Figura 4.6).

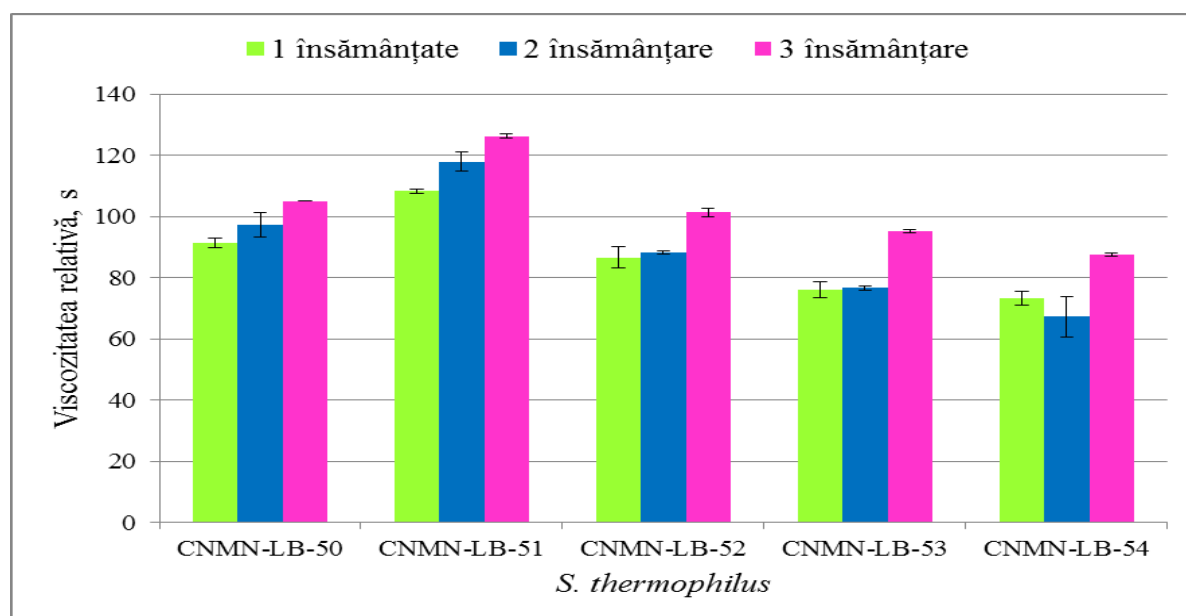


Fig. 4.6. Variația vîscozității relative a laptelui cultivate timp de 6 ore.

În timpul însămânțării triple în lapte la tulpinile autohtone s-au restabilit proprietățile biotehnologice și prin sporirea sintezei EPS-lor, revenind la valori identice cu cele înainte de liofilizare (Figura 4.7).

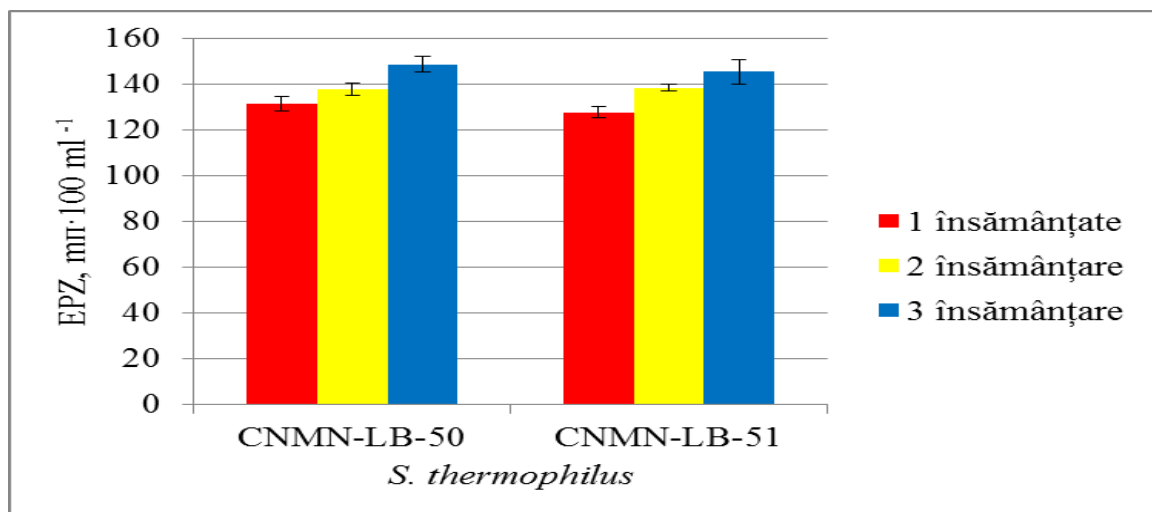


Fig. 4.7. Conținutul EPS-ilor la tulpinile de *S. thermophilus* cultivate timp de 6 ore.

Cercetările privind efectul liofilizării asupra indicilor biotehnologici (aciditatea activă, viscozitatea relativă, sinteza de EPS) demonstrează la toate 5 tulpini autohtone de *S. thermophilus* o dinamică de reducere nesemnificativă a valorilor acestor parametri după 6 luni de depozitare, care după 3 pasaje ale culturilor în lapte degresat, revin la valorile inițiale, restabilind proprietățile valoroase ale tulpinilor la nivel inițial.

4.2. Elaborarea asociațiilor simbiotice de bacterii lactice autohtone pentru iaurt

La elaborarea consorțiilor de bacterii lactice pentru culturi starter este important să se ia în considerare relația dintre tulpini și posibilele modificări în microfloră în timpul cultivării ulterioare în procesul de fabricare a produselor lactate.

Prin combinarea diferitor specii de bacterii lactice și prin reglarea temperaturii de fermentare este posibilă obținerea unui produs cu gust și aroma dorită, textură și proprietăți dietetice.

Din practică se știe că fabricarea iaurtului prezintă complicații frecvente pentru producători, deoarece consistența produselor este afectată de diverse acțiuni mecanice în procesul tehnologic, la transportare și depozitare. La fel și scăderea conținutului de grăsime influențează proprietățile structurale ale produsului, provocând eliminarea zerului și formarea granulelor.

Problema obținerii produselor lactate fermentate cu textură stabilă se rezolvă în majoritatea cazurilor prin adăugarea stabilizatorilor și agenților de îngroșare. În ultimul timp, pentru a obține produse lactate sănătoase a fost aleasă calea de utilizare a culturilor starter funcționale cu proprietăți capabile de a înlocui stabilizatorii de altă natură, prin combinarea culturilor de bacterii lactice mezofile tradițional utilizate, care sunt sensibile la bacteriofagi și la calitatea laptelui, cu bacterii lactice termofile din specia *S. thermophilus* [160], care spre deosebire de cele mezofile sunt mai active și stabile din punct de vedere biotehnologic [131].

În studiile anterioare, descrise în capitolul 3, în rezultatul cercetărilor de izolare, identificare și studiere a proprietăților biotehnologice ale tulpinilor de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* au fost selectate 5 tulpini autohtone noi valoroase pentru industria laptelui, dintre care 2 tulpini producătoare de EPS.

În continuare ne-am propus drept scop de a valorifica potențialul biotehnologic al tulpinilor selectate, prin includerea lor în asociații simbiotice de bacterii lactice pentru utilizarea lor în prepararea culturilor starter. Pentru început, tulpinile liofilizate la etapa precedentă a studiului au fost reactivitate din stare liofilizată, cu evaluarea ulterioară a caracteristicilor lor biotehnologice. Rezultatele evaluării sunt prezentate în Tabelul 4.1.

Tabelul 4.1. Caracteristicile tehnologice ale culturilor liofilizate de *S. thermophilus*

Caracteristici	Tulpini <i>Streptococcus thermophilus</i>				
	LB-50	LB-51	LB-52	LB-53	LB-54
Durata de restabilire, ore	6,0±0,5	6,0±0,2	6,8±0,3	6,4±0,2	6,7±0,3
Aspectul microscopic	Coci, asociați în diplococi și în lanțuri de diferite lungimi		Coci, asociați în diplococi		
Aspectul coagulului	Omogen, vâcos, filant		Omogen, nevâcos		
Consistența	Densă cremoasă			Densă	
Eliminarea zerului	fără eliminare de zer				
Activitatea acidifiantă în lapte integral, inocul 5% cultură					
Durata coagulării, ore	4,0±0,1	3,8±0,2	3,6±0,2	4,0±0,1	5,0±0,1
Aciditatea titrabilă, °T	77,0±1,0	73,0±1,0	69,3±1,2	74,7±0,6	73,7±1,2
Viscozitatea cinematică, cSt	41,7±0,6	42,3±0,6	70,3±0,6	51,7±0,7	45,7±1,1
EPS, mg/100 ml	44,6±5,0	55,6±4,0	0	0	0

Conform Reglementării Tehnice iaurtul este un produs lactat fabricat prin fermentarea laptelui cu culturi starter ce conțin speciile *S. thermophilus* și *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Relația dintre cele două specii în culturile starter este de simbioză, ceea ce este important pentru formarea acidului lactic, gustului tipic și aromei produsului.

De aceea pentru formarea consorțiilor de bacterii lactice utilizate la fabricarea iaurtului, din Colecția Ramurală de Bacterii Lactice (Direcția Tehnologii Alimentare, IȘPHTA) au fost selectate și testate tulpini autohtone de *Lb. bulgaricus*.

Culturile, de asemenea, au fost restabilite din stare liofilizată și apreciate după principalele criterii tehnologice: durata de restabilire, aspectul coagulului, aspectul microscopic

al celulelor, activitatea acidifiantă în lapte integral cu inocul de 5% cultură. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 4.2.

Tabelul 4.2. Caracteristicile tehnologice ale tulpinilor *Lb. bulgaricus*

Caracteristici	Tulpini <i>Lactobacillus bulgaricus</i> CNMN-				
	LB-40	LB-41	LB-42	LB-43	LB-44
Durata de restabilire, ore	17,8±0,2	15,6±1,9	6,6±0,4	17,7±0,4	34,3±1,5
Aspectul coagulului	Omogen vâscos				
Consistența	densă			moderat densă,	moderată
Eliminarea zerului	fără eliminare de zer				cu eliminare de zer
Aspectul microscopic	Bacili separați, și asociați în lanțuri de diferite lungimi				
Activitatea acidifiantă în lapte integral, inocul 5% cultură					
Durata coagulării, ore	4,5±0,3	3,7±0,3	4,1±0,1	4,5±0,5	7,2±0,3
Aciditatea titrabilă, °T	131,3±1,5	124,3±0,6	119,0±1,0	120,0±2,0	124,5±2,5
Viscozitatea cinematică, cSt	17,5±0,3	15,2±0,3	27,3±2,5	19,3±0,8	11,9±0,6
EPS, mg/100 ml	0	0	0	0	0

Din datele prezentate putem concluziona că 4 culturi de *Lb. bulgaricus* CNMN-LB-40, CNMN-LB-41, CNMN-LB-42, CNMN-LB-43 – s-au restabilit în timpul necesar, conform cerințelor: maximum 20 ore. Culturile restabilite au format coagul în 3,5-4±0,5 ore, cu aspect omogen, consistență densă, la unele puțin vâscos, gust curat de lapte fermentat, cu aciditate titrabilă moderată între 89-94 °T [9]. Tulpina *Lb. bulgaricus* CNMN-LB-44 s-a restabilit cu întârziere de 16 ore, formând un coagul moderat, ceea ce nu corespunde cerințelor tehnologice și deci nu poate fi aplicată în combinațiile pentru culturile starter destinate fabricării iaurtului. Coagulul obținut prin fermentare de către tulpinile cercetate a avut un indice de viscozitate mic cuprins între 11,13 – 28,84 cSt. Nici o tulpină nu produce EPS. Tulpina *Lb. bulgaricus* CNMN-LB-42 a fost selectată pentru utilizare în componența culturilor starter destinate fabricării iaurtului. Adevărul de depozitare și pașaportul tulpinii este prezentat în Anexa 6.

La etapa următoare au fost efectuate cercetări privind asocierea tulpinilor *S. thermophilus* în cadrul speciei.

Pentru crearea asociațiilor între tulpinile de aceeași specie, tulpinile selectate de *S. thermophilus* au fost combinate treptat în raport 1:1, studiindu-se compatibilitatea lor la nivel de acțiune acidifiantă și coagulantă [3, 13]. Tulpinile au fost inoculate în lapte (20-30 ml). După incubare, până la obținerea coagulului, combinațiile obținute au fost reînsămânțate de două ori în lapte degresat steril. Au fost selectate asociații, ce au demonstrat acțiune de acidogeneză intensă

– în maxim 5 ore, cu formarea unui coagul omogen, dens, cremos sau vâscos cu filanță moderată.

Au fost elaborate 7 asociații de tulpini în cadrul speciei *S. thermophilus*:

1. Cultura cu EPS - *S. thermophilus* CNMN-LB-50 + *S. thermophilus* CNMN-LB-51;
2. Cultura cu EPS - *S. thermophilus* CNMN-LB-50 + *S. thermophilus* CNMN-LB-52;
3. Cultura cu EPS - *S. thermophilus* CNMN-LB-50 + *S. thermophilus* CNMN-LB-53;
4. Cultura cu EPS - *S. thermophilus* CNMN-LB-50 + *S. thermophilus* CNMN-LB-54;
5. Cultura cu EPS - *S. thermophilus* CNMN-LB-51 + *S. thermophilus* CNMN-LB-52 + *S. thermophilus* CNMN-LB-53;
6. Cultura cu EPS - *S. thermophilus* CNMN-LB-51 + *S. thermophilus* CNMN-LB-54;
7. Cultura fără EPS - *S. thermophilus* CNMN-LB-52 + *S. thermophilus* CNMN-LB-53 + *S. thermophilus* CNMN-LB-54;

Asociațiile au fost studiate conform indicilor biotehnologici. Rezultatele investigațiilor sunt prezentate în Tabelul 4.3.

Tabelul 4.3. Caracteristicile asociațiilor de tulpini în cadrul speciei *S. thermophilus*

Nr. crt.	Durata coagulării, ore	Aciditatea titrabilă, °T	Viscozitatea, cSt	Cantitatea de EPS, mg/100 ml	Aspectul coagulului
1	3,6±0,1	74±1	43±1	81,7±2,1	O, F ⁺ , C, fz
2	3,4±0,2	72,3±2,1	52,7±2,5	46,3±1,5	O,V,F,D,C,fz
3	4,0±0,1	76±1	46,3±1,5	43,1±1,0	O,V,F,D,C,fz
4	4,2±0,3	74±1	48,3±1,5	40,±1,5	O,V,F,D,C,fz
5	3,6±0,2	75,3±1,5	50,3±0,5	56,3±5,5	O,V,F,D,C,fz
6	3,7±0,3	74,3±0,5	44,0±2,6	53,6±3,2	O,V,F,D,C,fz
7	3,9±0,1	75,0±1,0	62,0±2,6	0	O,nV,D,fz

Notă: O – omogen, V – vâscos, nV – nevâscos, F – filant, F⁺ - foarte filant, D – dens, C – cremos, fz – fără eliminarea zerului.

Asociațiile nr. 3 și 4 manifestă caracteristici biotehnologice foarte bune, fermentând laptele în 4-4,5±0,5 ore (conform cerințelor durată de fermentare trebuie să fie 6 ore). Asociația nr.3 manifestă viscozitate moderată – 51,96 cSt, comparativ cu nr.2. Combinațiile de tulpini de bacterii lactice de *S. thermophilus* nr. 5 și 6 în compoziția cărora este inclusă tulpina *S. thermophilus* CNMN-LB-51 la fel prezintă mare interes tehnologic și pot fi utilizate în calitate de culturi starter pentru fabricarea produselor lactate fermentate. Însă a fost remarcat faptul că asociațiile de tulpini nr. 4 și 6 posedă caracteristici aproape similare. Când privește asociația nr.7, formată din tulpini neproducătoare de EPS, aceasta a demonstrat viscozitate slabă - 30,89 cSt și aciditate moderată – 61 °T, și poate fi utilizată doar pentru fabricarea produselor lactate grase cu aciditate redusă.

În rezultatul examinării a 7 culturi starter formate din culturi *S. thermophilus* se poate constata faptul că toate asociațiile pot servi în calitate de culturi starter pentru utilizarea în producere, dintre care 6 asociații producătoare de EPS și 1 neproducătoare de EPS. Totuși cele mai reușite combinații care pot fi utilizate în fabricarea iaurtului sunt **nr. 1 – *S. thermophilus* CNMN-LB-50 + *S. thermophilus* CNMN-LB-51**, formează coagul filant cu aciditatea titrabilă moderată $68 \pm 1^\circ\text{T}$, **nr. 2 – *S. thermophilus* CNMN-LB-50 + *S. thermophilus* CNMN-LB-52**, formează coagul dens, vâscos și **nr. 7 – *S. thermophilus* CNMN-LB-52 + *S. thermophilus* CNMN-LB-53 + *S. thermophilus* CNMN-LB-54**, formează coagul dens, pentru fabricarea produselor lactate fermentate nevâscoase.

De asemenea, a fost creată și o combinație din toate 5 tulpini studiate de *S. thermophilus* CNMN-LB-50, CNMN-LB-51, CNMN-LB-52, CNMN-LB-53, CNMN-LB-54 și incorporată în cultura starter pentru fabricarea brânzeturilor tari. În cadrul SA “SUCCES”, or. Râșcani, a fost produs un lot experimental de produs de brânză, certificatul de implementare a căruia este prezentat în Anexa 7. În rezultatul implementării s-a constatat că tulpinile autohtone sunt competitive cu cele de import și asigură fermentarea laptelui și atingerea nivelului necesar de aciditate conform cerințelor pentru fabricarea brânzeturilor tari.

Produsele lactate fermentate sunt foarte populare în întreaga lume datorită proprietăților specifice și efectului benefic asupra organismului uman. Un rol crucial în fabricarea lor îl joacă procesele biochimice cauzate de culturile starter. Prin urmare, calitatea produselor lactate depinde de calitatea culturilor starter utilizate la producerea acestora, care, la rândul lor, sunt determinate de caracteristicile microorganismelor din cadrul culturii starter.

Culturile starter pentru fabricarea iaurtului trebuie să fie alcătuite din tulpini din speciile *S. thermophilus* și *Lb. bulgaricus*. De aceea la etapa următoare au fost create și studiate asociațiile formate din lactobacili și streptococi termofili. În baza asociațiilor formate în cadrul speciilor, au fost alcătuite combinații de tulpini pentru culturi starter destinate fabricării iaurtului:

1. *S. thermophilus* CNMN-LB-50 + *S. thermophilus* CNMN-51 + *Lb. bulgaricus* CNMN-LB-42 – cultură starter cu EPS;
2. *S. thermophilus* CNMN-LB-50 + *S. thermophilus* CNMN-52 + *Lb. bulgaricus* CNMN-LB-42 – cultură starter cu EPS;
3. *S. thermophilus* CNMN-LB-53 + *S. thermophilus* CNMN-LB-54 + *Lb. bulgaricus* CNMN-LB-42 – cultura starter clasică.

Cele 3 asociații au fost supuse studiului după principalii parametri tehnologici, rezultatele căruia sunt reprezentate în Tabelul 4.4.

Rezultatele obținute în urma asocierii speciilor *S. thermophilus* și *Lb. bulgaricus* în culturile starter pentru fabricarea iaurtului, indică o creștere a cantității de EPS sintetizate de

tulpinile *S. thermophilus* CNMN-LB-50 și *S. thermophilus* CNMN-LB-51 comparativ cu rezultatele obținute la fermentarea laptelui separat cu tulpini individuale, deci s-a dovedit efectul simbiotic al culturilor *S. thermophilus* și *Lb. bulgaricus*. Cultura starter formată din 2 tulpini producătoare de EPS are o vâscozitate moderată în comparație cu alte asociații formate.

Tabelul 4.4. Caracteristicile asociațiilor de tulpini autohtone pentru iaurt

Cultura starter	Durata coagulării, ore	Aciditatea titrabilă, °T	Viscozitatea, cSt	Cantitatea de EPS, mg/100 ml	Aspectul coagulului
1	3,5±0,5	112±2	43,97±1,3	58,43±1,9	O, V, F, D, fz
2	3,5±0,5	118±1	70,25±1,72	47,49±1,3	O, V, F, D, fz
3	4±0,5	98±2	106,51±1,0	0	O,D, nF,fz

Notă: O – omogen, V – vâscos, nV – nevâscos, F – filant, D – dens, fz – fără eliminarea zerului.

Cea mai înaltă valoare de viscozitate are coagulul format cu utilizarea asociației de tulpini nr.3: coagulul este dens, nefilant. În toate variantele aciditatea titrabilă a fost în limitele admisibile – 98-118 °T, nu a fost depistată eliminarea zerului. Deci, asociațiile formate corespund cerințelor față de culturile starter destinate fabricării produselor lactate fermentate [9].

De asemenea, a fost efectuat examenul microscopic al culturilor starter elaborate pentru determinarea raportului dintre culturile de *S. thermophilus* și *Lb. bulgaricus*. Rezultatele sunt reprezentate în Figura 4.8.

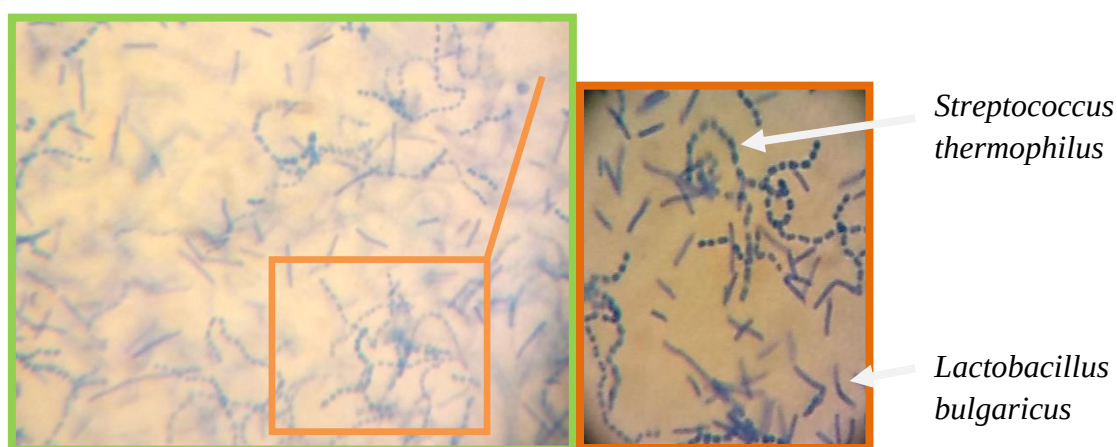


Fig. 4.8. Aspectul microscopic al asociațiilor formate, MOx100 (Autorul foto Cartășev A.).

În rezultatul studiului dat au fost elaborate 3 culturi starter destinate fabricării iaurtului:

1. YO1 – *S. thermophilus* CNMN-LB-50, CNMN-LB-51 și *Lb. bulgaricus* CNMN-LB-42;
2. YO2 – *S. thermophilus* CNMN-LB-50, CNMN-LB-52 și *Lb. bulgaricus* CNMN-LB-42;
3. YO3 – *S. thermophilus* CNMN-LB-52, CNMN-LB-53, CNMN-LB-54 și *Lb. bulgaricus* CNMN-LB-42;

Culturile starter compuse au fost testate privind caracteristicile tehnologice și caracterul simbiotic al tulpinilor în cazul culturilor multiple pentru a fi selectate cele cu un potențial mai

mare de utilizare la fabricarea produselor lactate fermentate. Culturile au fost inoculate în lapte degresat în cantitate de 5%.

La etapa inițială a fost analizată activitatea de acidogeneză a culturilor starter elaborate.

Ca rezultat al studiilor privind activitatea de acidifiere a culturilor starter timp de 8 ore de cultivare la temperatura de 40 ± 1 °C, s-a constatat scăderea acidității culturilor starter pe parcursul a 5 ore de cultivare atingând valori egale cu $4,58 \pm 0,02$ – $4,31 \pm 0,03$ unități ale pH-ului. După 5 ore de cultivare, când coagulul este deja format, reducerea acidității active a culturilor continuă cu unele devieri neînsemnate. După 8 ore de cultivare aciditatea activă a atins următoarele valori: pH-ul culturilor YO1 – $4,17 \pm 0,05$, YO2 – $4,15 \pm 0,02$, YO3 – $4,28 \pm 0,01$, care după 8 ore nu s-au schimbat esențial, de unde putem concluziona că culturile starter nu vor cauza deteriorarea produsului finit pe parcursul depozitării.

Viscozitatea coagulului lactat este o caracteristica foarte importantă la fabricarea produselor lactate fermentate. Măsurarea proprietăților reologice oferă informații referitoare la natura și consistența structurii formate, pentru că consistența produsului este determinată de structura sa.

A doua etapă a studiului culturilor starter a avut drept scop determinarea viscozității, numărului de microorganisme lactice viabile, a cantității de EPS în cazul culturilor starter compuse din tulpini autohtone capabile de sinteză a polimerilor extracelulari. Caracteristicile biotehnologice și proprietățile de producere valoroase au fost examinate în laptele degresat steril la temperatura optimală de cultivare a culturilor termofile 40°C.

Datele prezentate în Tabelul 4.5 caracterizează culturile starter elaborate ca acidifiianți moderați, concentrația acidului lactic format fiind în limitele de 1,008-1,152 %. Conform cerințelor tehnologice pentru culturile starter destinate fabricării iaurtului, rata acidului lactic trebuie să fie între 0,7- 1,26%. În pofida faptului că tulpină selectată de *Lb. bulgaricus* a manifestat o acidifiere a laptelui cu grad înalt de aciditate în cazul dat, în asociere cu tulpinile din specia *S. thermophilus* demonstrează o concentrație de acid lactic la nivel moderat.

Tabelul 4.5. Caracteristicile biotehnologice ale culturilor starter autohtone

Cultura starter	Caracteristicile biotehnologice			
	NMLV, lgUFC/g	Cantitatea de EPS, mg/100 ml	Sinereza, cm ³	Aciditatea titrabilă, (% acid lactic)
YO1	9,698	$65,1 \pm 1$	absentă	$1,008 \pm 0,005$
YO2	9,342	$56,6 \pm 1$	absentă	$1,152 \pm 0,013$
YO3	8,114	-	absentă	$1,062 \pm 0,01$

Acest fenomen poate fi explicat în felul următor: *S. thermophilus* stimulează creșterea *Lb. bulgaricus* prin reducerea acidității laptelui, schimbarea potențialului redox al laptelui, utilizarea

oxigenului dizolvat în lapte și formarea CO₂. Astfel, *S. thermophilus* asimilând oxigenul din lapte, creează condiții anaerobe, necesare pentru creșterea *Lb. bulgaricus* [131].

Culturile starter elaborate conțin sute de milioane și miliarde de celule viabile active în 1 cm³ de lapte degresat și acest indicator demonstrează că tulpinile încadrate în asociații nu sunt antagoniste între ele.

Asociațiile care conțin EPS au consistență moderat filantă, toate mostrele sunt moderat de vâscoase. Aprecierea organoleptică a constatat gust și miros caracteristic produsului fabricării căruia sunt destinate culturile starter. Culturile starter care conțin tulpinile producătoare de EPS formează coagul omogen și dens, fără eliminarea zerului, ceea ce mărește rezistența coagulului și contribuie la stabilitatea produsului [49].

Următoarea etapă a constituit fabricarea lotului experimental de culturi starter liofilizate destinate fabricării iaurtului.

În scopul liofilizării și păstrării ulterioare, culturile starter autohtone elaborate au fost suspendate în mediul protector în raport de 1:1 și repartizate în flacoane tip penicilină a câte 4 ml. Liofilizarea a fost efectuată în instalația de marca Labconco, conform procedurii elaborat în Laboratorul de biotehnologii alimentare IȘPHTA [52]. Au fost obținute 3 loturi experimentale de culturi liofilizate, ce reprezintă 3 combinații de tulpini autohtone de bacterii lactice termofile pentru iaurt. După liofilizare s-au obținut câte 2 g cultură liofilizată în fiecare flacon.

Determinarea capacității de păstrare a indicilor de calitate pe parcursul termenului îndelungat de păstrare este importantă pentru culturile starter. De aceea au fost studiați indicii asociațiilor de tulpini de bacterii lactice pe parcursul a 6 luni de păstrare la temperatura -18±1 °C. Rezultatele studiului sunt expuse în Tabelul 4.6.

Tabelul 4.6. Dinamica numărului de bacterii lactice viabile în procesul de păstrare

Titrul bacteriilor lactice viabile, logUFC în 1ml	Durata păstrării, luni						
		1	2	3	4	5	6
	YO1	9,3±0,2	8,7±0,3	8,8±0,1	8,6±0,2	8,5±0,2	8,4±0,2
	YO2	8,9±0,1	8,8±0,1	8,6±0,1	8,4±0,1	8,2±0,1	8,1±0,1
	YO3	8,3±0,2	8,2±0,2	8,1±0,2	7,9±0,1	8,0±0,1	7,8±0,3

Rezultatele obținute arată că numărul de bacterii lactice practic nu s-a schimbat pe parcursul perioadei de cercetare (cu variații neînsemnate în limitele erorilor admise) și corespunde cerințelor pentru culturile starter utilizate la fabricarea produselor lactate fermentate. Copia Procesului verbal de producere a culturilor starter în condițiile de laborator se anexează (Anexa 8).

4.3. Includerea culturilor starter elaborate în procesul tehnologic de fabricare a iaurtului

În prezent se acordă o mare atenție calității și siguranței produselor lactate, care sunt consumate de populația de toate vârstele. În acest sens, este important de a verifica modul în care funcționează culturile la scară industrială de fabricare a produselor lactate fermentate, mai ales culturile producătoare de EPS [131].

Iaurturile fac parte din grupa populară a băuturilor fermentate din lapte, care conține o microfloră specifică și posedă proprietăți benefice pentru organismul uman. Microflora iaurtului are un efect benefic asupra tractului digestiv, ajută la menținerea echilibrului microflorei intestinale, este o sursă de minerale și vitamine din grupului B. Iaurtul fermentat cu culturi lactice vii poate fi consumat de către persoanele cu intoleranță de lactoză.

În ultimii ani, pe piața internă a apărut o mare varietate de iaurturi, unele dintre cu o calitate semnificativ diferită de iaurtul tradițional. Situația dată a condus la introducerea Reglementării Tehnice “Lapte și produsele lactate”, în care se stabilește că iaurtul este un produs lactat fabricat prin fermentarea laptelui cu culturi starter de *S. thermophilus* și *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* [24]. Producătorii utilizează stabilizatori pentru îmbunătățirea consistenței, parametrilor structurali și reologici, în special la iaurtul cu conținut redus de grăsime, care este solicitat de consumatori, în conformitate cu recomandările nutriționiștilor. De aceea, este important de a oferi producătorului posibilitatea de a produce iaurt cu o consistență și caracteristici reologice necesare, fără a utiliza stabilizatori.

Pentru acest studiu a fost ales iaurtul clasic cu un conținut de grăsime de 2,5%. La fel, ținând cont de tendința de a fabrica produse cu un conținut redus de grăsime, a fost preparat și iaurtul degresat cu conținut de grăsime de 0,1% . Pentru această au fost calculate rețetele pentru fabricarea iaurtului care sunt prezentate în Tabelul 4.7.

Tabelul 4.7 Rețete de producere a sortimentului de iaurt (pentru 100 kg de produs finit fără evidența pierderilor)

Materie primă	Iaurt 2,5% de grăsime	Iaurt degresat
Lapte de vacă 3,5% de grăsime	71,0	1,5
Lapte degresat	24,0	93,5
Cultura starter reactivată pe lapte degresat	5,0	5,0
TOTAL	100	100

În condiții industriale, la Concernul „JLC GROUP” din mun. Chișinău, a fost fabricată o serie de iaurt cu conținut diferit de grăsime, folosind culturile starter elaborate YO1, YO2 și YO3. Fermentația a fost efectuată la temperatura de 40 ± 1 °C, după tehnologia tradițională – iaurt prin metoda la rezervor. Copia certificatului de producere în condiții industriale este prezentat în Anexa 9.

Materia primă utilizată în procesul de fabricare a iaurtului a fost laptele și smântână dulce cu parametri fizico-chimici după cum urmează: pentru lapte - aciditatea titrabilă 16 ± 1 °T, aciditatea activă pH $6,45 \pm 0,5$, fracția masică de grăsime $2,5 \pm 0,1\%$, fracția masică de proteine $2,8 \pm 0,3\%$; pentru laptele degresat – aciditatea titrabilă 17 ± 1 °T, aciditatea activă pH $6,5 \pm 0,5$, fracția masică de grăsime $10,0 \pm 0,1\%$, fracția masică de proteine $2,8 \pm 0,3\%$, iar caracteristicile organoleptice ale laptelui fiind: după aspectul exterior și consistență – lichid netransparent, omogen fără sediment, nefilant; laptele degresat – lichid cu gust și miros pur, fără miros și gust străin, nespecific laptelui proaspăt; culoare – albă, uniformă în toată masa. Materia primă a fost selectată în conformitate cu Reglementarea tehnică ”Lapte și produse lactate”.

Amestecurile normalizate au fost pasteurizate la temperatura de $87 \pm 2^\circ\text{C}$ timp de 10 sec. Apoi amestecurile normalizate au fost răcite până la temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$ și însămânțate cu culturi starter YO1 și YO2 cu EPS. Au fost fabricate loturi de control cu utilizarea culturilor starter elaborate fără EPS (YO3). În toate loturile a fost introdusă cultura starter în cantitate de 5%. Procesul de fermentare a durat până la atingerea acidității active – pH 4,6. După finalizarea procesului de fermentare produsele lactate au fost puse la rece – $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Au fost studiate proprietățile senzoriale, fizico-chimice și microbiologice ale produselor lactate obținute.

Culturile starter au fost brevetate prin aplicare la produsul lactat praf [3]. Copia brevetului de invenție și distincțiile obținute la saloanele internaționale de invenții pentru această elaborare sunt prezentate în Anexa 11 și Anexa 12.

Caracteristicile de calitate ale iaurturilor tradiționale și degresate:

Evaluarea calității iaurturilor fabricate în condițiile industriale cu utilizarea culturilor elaborate în cadrul tezei de doctorat a fost inițiată prin studiul caracteristicilor microbiologice, care sunt cele mai importante la etapa de apreciere a calității produselor alimentare.

A fost apreciată evoluția numărului de microorganisme lactice în procesul de fermentare și în produsele finite. Datele obținute sunt prezentate în Figura 4.9.

Astfel, iaurtul fabricat cu utilizarea culturilor starter YO1 și YO2 cu EPS , în comparație cu cel de control - fermentat de YO3, au demonstrat prezența unui număr mai mare de celule. Cea mai mare valoare a bacteriilor lactice ($9,3 \pm 0,02$ Ig CFU în 1 ml de proba) a fost determinată în iaurtul de 0,1% fermentat de către cultura YO1.

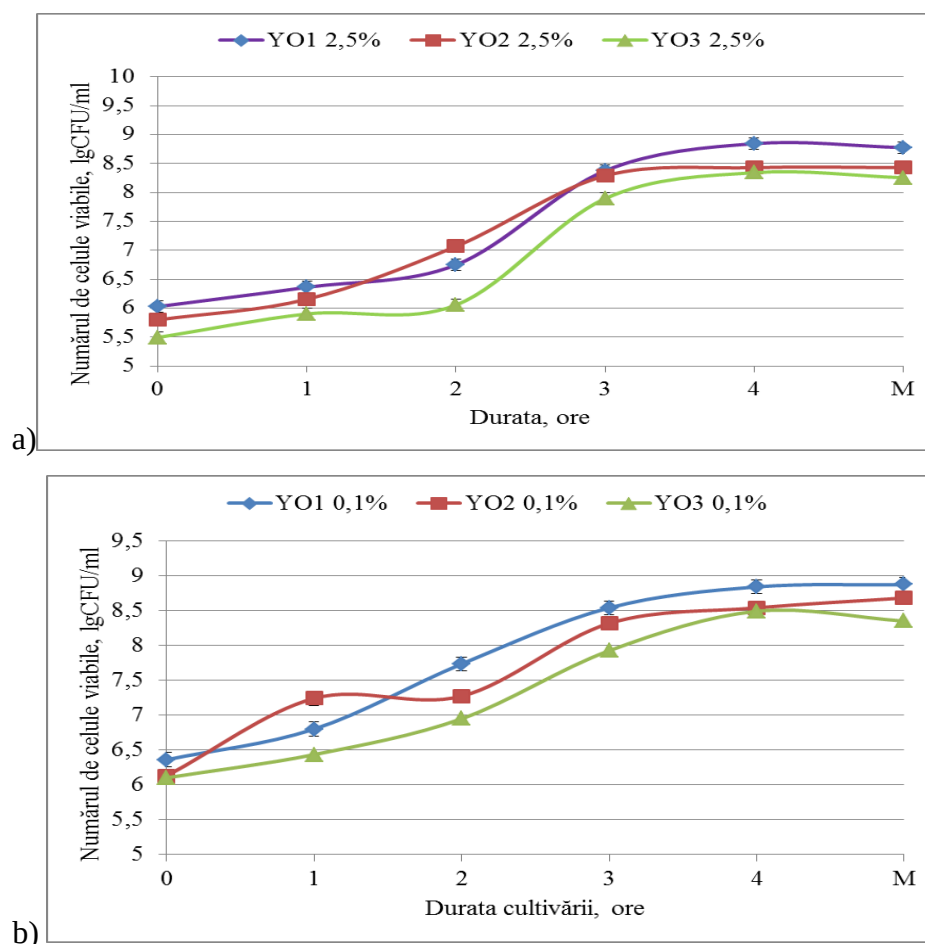


Fig. 4.9. Modificarea numărului de bacterii lactice în procesul de fermentare și după maturizare;
a) iaurtului 2,5% grăsime și b) a iaurtului 0,1% grăsime.

Conform cerințelor stipulate în documentele normative pentru iaurt, nivelul de bacterii lactice în 1 ml de produs trebuie să fie minim 10 mln. În cazul nostru putem constata că culturile starter testate în producere asigură produsul lactat cu microorganisme benefice din abundență. Din datele prezentate rezultă că după maturizare la temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$, numărul de bacterii lactice în mostre a rămas aproape de nivelul înregistrat la finalizarea procesului de fermentare.

Mostrele de iaurt cu conținut diferit de lipide au fost evaluate privind prezența bacteriilor patogene, drojdiilor și micromicetelor. Datele sunt expuse în Tabelul 4.8.

Tabelul 4.8. Caracteristica microbiologică a mostrelor de iaurt

Indicii	Rezultatele cercetărilor
Bacterii coliforme, în 1,0 g	Nu s-au depistat
Microorganisme patogene inclusiv <i>Salmonella</i> , în 25 g	Nu s-au depistat
<i>Staphylococcus aureus</i> , în 1,0 g	Nu s-au depistat
Drojii, UFC/1 g, max	Nu s-au depistat
Micete, UFC/1 g, max	Nu s-au depistat

Mostrele de iaurt cu conținut diferit de grăsime corespund cerințelor indicate în „Reguli privind criteriile microbiologice pentru produsele alimentare” [25]

La etapa următoare au fost analizate caracteristicile senzoriale și fizico-chimice ale mostrelor de iaurt. Pe parcursul procesului de fermentare și în produsul finit au fost apreciați parametrii organoleptici: aspectul exterior, gustul și mirosul, culoarea, textura și parametrii fizico-chimici: aciditatea titrabilă, aciditatea activă și sinereză. Caracteristicile organoleptice ale mostrelor experimentale de iaurt fabricat cu utilizarea culturilor starter elaborate pe bază de tulpini autohtone a fost evaluată de comisia de degustare din cadrul Direcției "Tehnologii Alimentare" a IP IȘPHTA, fapt confirmat prin procesul verbal de degustare (Anexa 10).

Fiecare degustator a evaluat calitățile senzoriale a 6 variante de iaurt, notându-le în conformitate cu scara de punctaj prezentată în fișa de analiză senzorială. Evaluarea fiecărei caracteristici organoleptice în condițiile descrise a fost realizată prin comparare cu scări de punctaj de 0-5 puncte și obținerea punctajului mediu dat de grupa de degustători. Rezultatele examinărilor sunt prezentate în Figura 4.10.

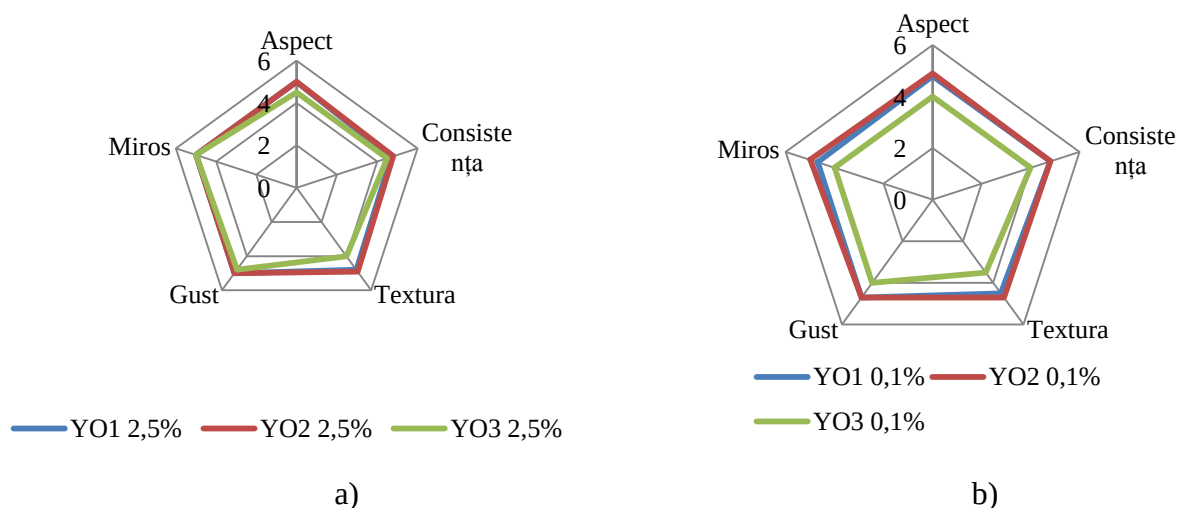


Fig. 4.10. Profilul senzorial al iaurturilor: a) 2,5% de grăsime b) 0,1% de grăsime.

Iaurturile fabricate cu culturi starter producătoare de EPS (YO1 și YO2) cu 2,5% de grăsime au fost caracterizate astfel: coagulul de consistență fermă, textura vâscoasă, fără bule de gaz și eliminare de zer, cu aspect de porțelan, de culoare albă cu nuanța gălbuie, aromă specifică de iaurt, cu caractere specifice fermentației lactice și gust plăcut, acrișor.

Iaurtul 2,5% de grăsime fermentat cu cultura YO3 a avut o caracteristică similară, cu unica deviere ce se referă la textură, care a fost moderat de densă, dar conform cerințelor.

Iaurtul degresat (0,1% de grăsime) fabricat cu culturi bacteriene producătoare de EPS a avut coagul de consistență potrivită, cu eliminare slabă de zer (max. 2%), aromă specifică de iaurt, cu caractere specifice fermentației lactice, gust acrișor mai pronunțat comparativ cu

variantele de 2,5 % de grăsime. Textura a fost filantă, fluidă și omogenă, în care nu au fost evidențiate aglomerări și rupturi. Cel mai mic punctaj a obținut iaurtul fermentat cu cultura YO3, pentru că în comparație cu variantele menționate mai sus coagulul a avut aspect ușor nisipos. Totuși, cu aceste devieri texturale, iaurtul cu 0,1% produs cu cultura starter YO3 a fost apreciat pozitiv.

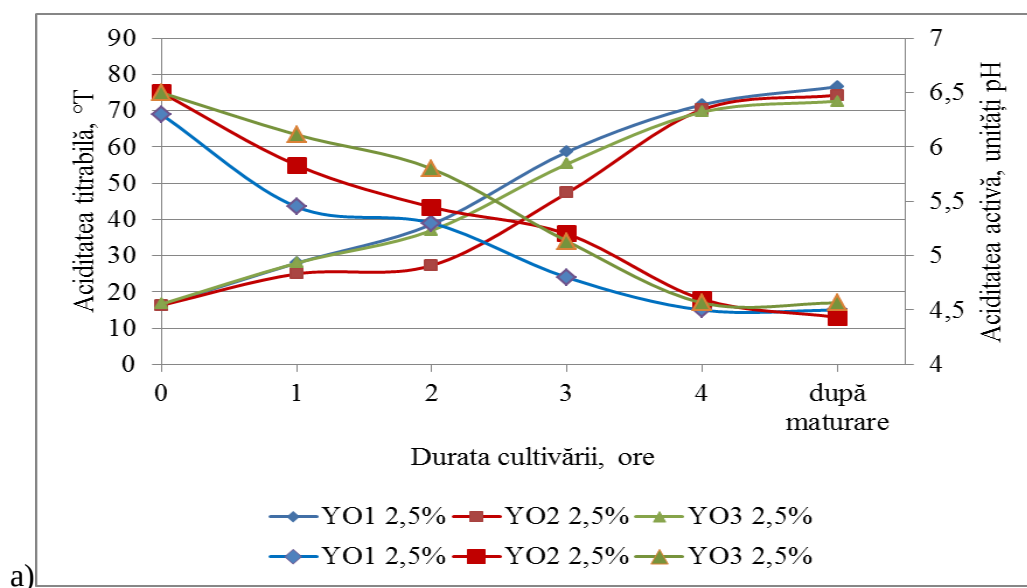
Astfel, proprietățile organoleptice ale iaurtului cu conținut diferit de grăsimi fabricat cu utilizarea culturilor starter YO1 și YO2, care conțin tulpini de *S. thermophilus* producătoare de EPS au obținut cele mai bune rezultate.

Creșterea acidității titrabile și scăderea acidității active au fost aproape identice la toate mostrele examinate. Rezultatele sunt prezentate în Figura 4.11.

Astfel, dinamica creșterii acidității titrabile a mostrelor de iaurt obținut prin fermentarea laptelui cu cultura starter YO1 a crescut aproape identic în primele 3 ore de cultivare, iar valoarea finală a fost de 77 ± 1 °T. Evoluția acidității titrabile a acestor mostre pentru primele 3 ore de fermentare a fost de 30-32 °T, în contrast cu mostrele de iaurt fermentate de cultura YO2, unde în primele 3 ore s-a observat creșterea mai lentă a acidității – de 22-25 °T.

Cantitatea de metaboliți (acid lactic) a crescut până la 73 ± 3 °T (Figura 4.11, a). Iaurtul cu conținut de grăsime 0,1% fermentat de cultura producătoare de EPS s-a caracterizat prin acumulare rapidă a acidului lactic în primele 3 ore cu 31°T (Figura 4.11, b). Scăderea valorii pH-ului a fost similară, dar după maturarea produselor lactate fermentate, mostrele de iaurt obținut prin activitatea culturii YO3 au demonstrat valori mai mici ale pH-ului, egale cu 4,3-4,4.

Aciditatea titrabilă a tuturor mostrelor a crescut puțin și aciditatea activă nu s-a schimbat mult, de aceea putem concluziona că valorile finale ale acidității mostrelor de iaurt cu diferit conținut de grăsime corespund exigențelor Reglementării Tehnice "Lapte și produsele lactate".



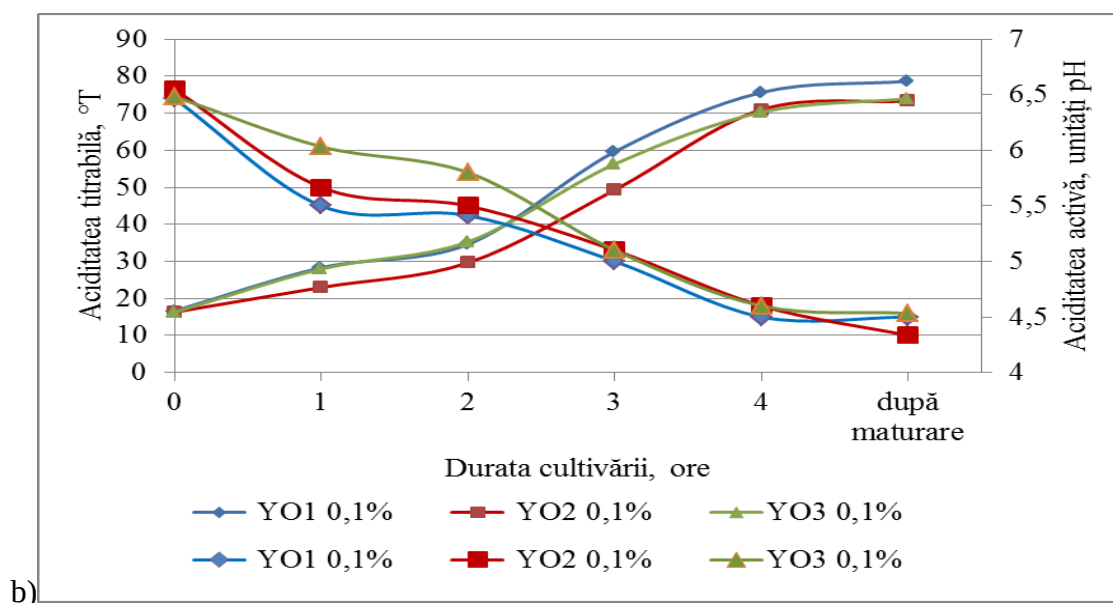


Fig. 4.11. Modificarea acidității titrabile și a acidității active a iaurtului: a) iaurt 2,5% grăsime, b) iaurt 0,1% grăsime.

Prin urmare, datele obținute au demonstrat avantajul utilizării culturilor producătoare de EPS în culturile starter pentru fabricarea iaurtului.

Au fost studiate caracteristicile fizico-chimice de calitate a mostrelor de iaurt fabricate. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 4.9.

Tabelul 4.9. Caracteristicile fizico-chimice a mostrelor de iaurt

Indicii	Cerințe *	Iaurt 2,5%	Iaurt 0,1%
Fracție masică de grăsime, %	max. 15%	2,6	0,15
Fracție masică de proteine, %	min. 2,7%	3,5	3,1
Fracție masică de SUD, %	min. 9,5%	12,4	10,1

Notă: * conform [22] ”

Un indicator important la fabricarea produselor lactate fermentate cu conținut redus de grăsime este sinereza – separarea zerului. Pentru probele de iaurt fabricate cu utilizarea culturilor starter producătoare de EPS, după maturare și în timpul depozitării, nu a fost detectată sinereza. Iaurtul degresat fabricat cu cultura YO3 a manifestat separarea zerului în cantitate de 0,8%.

Proprietățile deosebite ale tulpinilor *S. thermophilus* autohtone sunt confirmate prin brevetul de invenție de scurtă durată MD-865 din 2015.01.31 „Procedeul de obținere a produsului lactat praf” (Anexa 11).

Următoarea etapă a evaluării indicilor de calitate a iaurturilor fabricate în condiții industriale a fost consacrată studiului proprietăților structurale ale produselor obținute prin fermentare cu culturi starter producătoare de EPS.

În procesul de fabricare a produselor lactate fermentate se acordă o atenție deosebită consistenței. Iaurtul prezintă un sistem coloidal, caracterizat prin legături tixotrope reversibile între particulele proteice. Acest produs prezintă un fluid vâscos elastic, adică posedă proprietăți vâscoase ale unui lichid și proprietăți elastice ale unui solid. Comportamentul reologic al acestor produse corespunde unui fluid non-newtonian.

În acest sens, viscozitatea produsului depinde de viteza de fortificare exercitată. În cazul iaurtului vâscozitatea scade odată cu creșterea vitezei de fortificare, iar vâscozitatea este caracterizată prin așa-numita vâscozitate aparentă la o viteză de fortificare dată.

Durata procesului de fermentare are un impact negativ asupra indicatorilor de calitate a produselor lactate fermentate. Acidul lactic acumulat în rezultatul activității microorganismelor reduce sarcina electrică a proteinelor, reducând astfel și proprietățile lor hidrofile (dehidrogenarea proteinelor și eliminarea zerului) . Această separare spontană se explică prin faptul că apa liberă umple numai volumul interior al sistemului structurat în coagulul format fără formarea legăturilor strânse fizico-chimice.

În continuare, au fost efectuate studii privind efectele culturilor starter multiple, ce conțin tulpini de *S. thermophilus* producătoare de EPS, asupra proprietăților structurale și mecanice ale iaurtului. În calitate de control a servit culturile starter cu tulpini neproducătoare de EPS. Evaluarea consistenței a fost realizată după vâscozitatea aparentă (dinamică) a produselor, gradul de sinereză, gradul de distrugere și restabilire a structurii coagulului [131].

Distrugerea structurii coagulului a fost efectuată timp de 2 min. Studiul nostru a arătat că timpul de relaxare de 30 de min este suficient pentru a restabili coagulul, creșterea timpului de relaxare nu a condus la o creștere a gradului de restabilire a structurii coagulului.

În rezultatul studiilor s-a determinat, că utilizarea culturilor starter producătoare de EPS blochează procesul de sinereză și conduce la creșterea capacității de reținere a apei în coagul, ceea ce se datorează faptului că EPS-le consolidează legăturile de apă cu componentele de lapte [49, 51].

Evaluarea consistenței iaurtului fermentat de către cultura starter, în componența căreia nu au fost introduse tulpini de *S. thermophilus* producătoare de EPS, a arătat că coagulul distrus manifestă tixotropie mai joasă decât la utilizarea în culturile starter a tulpinilor producătoare de EPS, fapt ce se datorează sistemului de compatibilitate termodinamic limitat de proteina din lapte. Acidul lactic prezent în produsul fermentat contribuie la procesul de hidroliză a proteinelor, însoțita de distrugerea structurii produsului.

Cercetările au stabilit că utilizarea culturilor starter multiple la fabricarea iaurtului cu conținut diferit de grăsime poate mări vâscozitatea acestora (1,543; 1,557, 1,567 și 1.559 Pa-s, respectiv) și caracteristicile tixotrope (reducerea degradării structurii și creșterea capacității de

restabilire a structurii), gradul inferior de distrugere fiind de 30,5%, iar cel mai înalt grad de reducere constituind 84,4%.

În experiențele ulterioare au fost studiați parametrii reologici, care caracterizează proprietățile mecanice ale coagulilor – indicatorul de vâscozitate a coagulului în funcție de viteza de fortificare, tensiunea de fortificare și viteza de distrugere a structurii. Rezultatele cercetării sunt reprezentate în fig. 4.12 și 4.13.

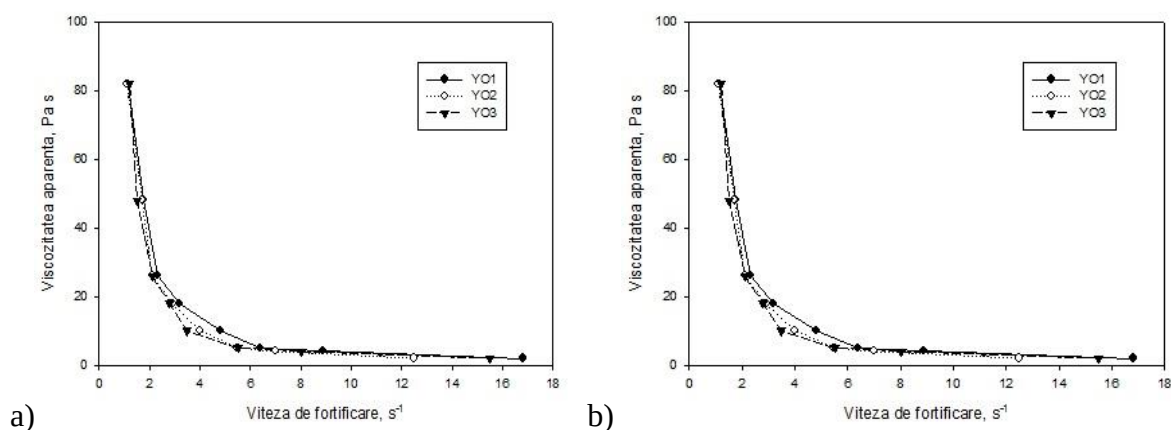


Fig. 4.12 Variația vâscozității aparente (dinamice) în funcție de viteza de fortificare pentru mostrele de iaurt: a) 2,5% de grăsime, b) 0,1% de grăsime.

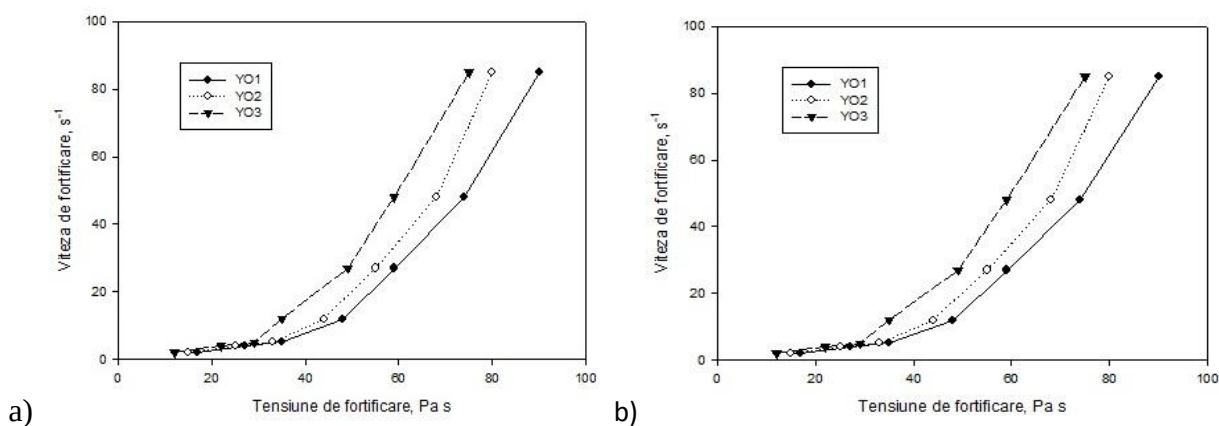


Figura 4.13. Tensiunea de fortificare în funcție de viteza de fortificare pentru probele de iaurt: a) 2,5% grăsime, b) 0,1% grăsime.

Rezultatele au arătat că vâscozitatea coagulului de iaurt la viteza de fortificare 1 s^{-1} în varianta experimentală YO1 2,5% și YO2 0,1% a fost mai mare decât la mostrele fermentate de YO3 2,5% și 0,1%.

Valoarea cea mai mare a tensiunii de fortificare a fost observată pentru varianta YO1 2,5% -16,5 Pa·s; pentru mostrele YO2 și YO3 – de la 12,4 Pa·s până la 15,6 Pa·s respectiv.

Astfel, utilizarea culturilor starter producătoare de EPS contribuie la reglarea procesului de structurare și îmbunătățește proprietățile mecanice ale produselor lactate fermentate în special cu conținut redus de grăsime.

Pentru a confirma datele obținute a fost studiată microstructura iaurtului fabricat cu utilizarea atât a culturilor starter producătoare de EPS cât și fără EPS, prezentată în Figura 4.14.

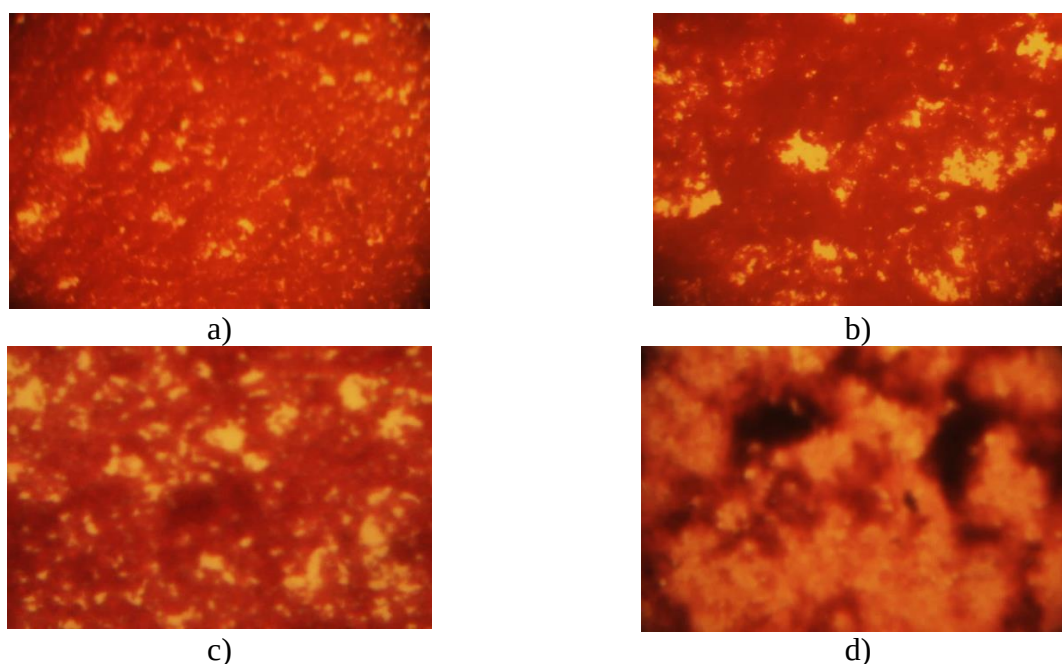


Fig.4.14. Microstructura iaurtului x40: a) 2,5% de grăsime+ EPS, b) 0,1% de grăsime+ EPS, c) 2,5% de grăsime– control, d) 0,1% de grăsime – control (Autor foto Cartășev A.).

Analiza microscopică a preparatului histologic a iaurtului fabricat cu utilizarea culturilor starter producătoare de EPS prezintă o structură omogenă, densă, mai ales varianta de iaurt cu 2,5% de grăsime, fără eliminarea zerului (Figura 4.14, a), complexe granulate de proteine din lapte sunt colorate în roz-maro (Figura 4.14). Iaurtul degresat fabricat cu tulpina producătoare de EPS de asemenea are structură compactă, proteinele din lapte sunt grupate într-un mod suficient în complexe mari, repartizate inegal, structura leagă apă liberă ce previne separarea zerului [55].

Este evident că EPS-le contribuie la legarea apei din produs și anume pentru produsele lactate degresate. Iaurtul cu 2,5% grăsime, produs cu cultura tradițională de control YO3 fără tulpini producătoare de EPS a avut aciditate mai mare în comparație cu iaurtul fabricat cu utilizarea culturii starter producătoare de EPS, observându-se agregarea proteinei în complexe mici, separate și repartizate neuniform (Figura 4.14 c), ceea ce a cauzat o capacitate mai mică de reținere a apei și separare a zerului [55]. Trebuie de remarcat faptul, că în cazul dat s-a separat 1% de zer, iar conform documentației în vigoare, pentru iaurt se admite separarea zerului în cantitate de până la 2%. În cazul iaurtului 0,1% fabricat cu cultura YO3, microstructura este neomogenă (Figura 4.14, d), complexe proteice sunt repartizate haotic cu interspații mari și eliminare de zer în cantitate de 3%. De aceea se poate constata faptul că iaurtul degresat poate fi fabricat cu utilizarea culturilor starter producătoare de EPS sau cu utilizarea sistemelor de stabilizare.

4.4. Determinarea termenului de valabilitate a iaurtului

În scopul stabilirii termenului de păstrare a iaurturilor, fabricate în condiții industriale, mostre din loturile experimentale au fost depuse la păstrare pe un termen de 20 zile. Prelungirea investigațiilor a fost determinată ținând cont de coeficientul de rezervă. Pentru produsele ușor alterabile el constituie 1,3 – pentru termenii de păstrare până la 30 zile. Conform metodelor utilizate în domeniul alimentar [146], iaurturile au fost cercetate la două regimuri de temperatură 4 ± 2 °C și la 9 ± 2 °C timp de 26 zile. Necesitatea efectuării cercetărilor în condiții de păstrare la temperaturi înalte se explică prin aceea că produsele lactate sunt ușor alterabile. Principiul utilizării temperaturilor înalte ține cont de posibilitatea întreruperii lanțului frigorific pe parcursul transportării produsului spre consumator și în legătură cu aceasta e posibilă activarea microflorei psihrotrofe. Mostrele păstrate au fost verificate periodic conform indicilor senzoriali, fizico-chimici, biochimici și microbiologici. Numărul investigațiilor periodice a mostrelor selectate a fost calculat ținând cont de termenul recomandat de păstrare și specificul produsului, în rezultat numărul punctelor de control constituind 5 unități.

Rezultatele investigațiilor senzoriale, fizico-chimice și microbiologice pentru o mostră de iaurt 2,5% de grăsime sunt prezentate în Tabelul 4.10.

Tabelul 4.10. Dinamica indicilor de calitate pe parcursul termenului de valabilitate a iaurtului.

Indicii	Periodicitatea, zile				
	1		15	20	26
Aspect exterior și consistență	Coagul de consistență potrivită, fără bule de gaz, nu exprimă zer, aspect de porțelan la rupere				
Culoarea	Albă, uniformă sau cu nuanță slab gălbuie				
Gust și miros	Specific de iaurt, plăcut, acrișor, fără gust sau miros străine				
Fracția masică de grăsime, %	2,5 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1
Fracția masică de SU, %	10,1 $\pm$ 0,1				
Aciditatea, °T	77 $\pm$ 0,1	77 $\pm$ 0,1	79 $\pm$ 0,1	78 $\pm$ 0,1	79 $\pm$ 0,1
Microorganisme lactice viabile, UFC, în 1g produs	1x10 ⁹	1x10 ⁹	1x10 ⁹	1x10 ⁹	1x10 ⁸
Bacterii coliforme, în 0,01g produs	Nu s-a depistat				
<i>Staphylococcus aureus</i> , în 1g produs	Nu s-a depistat				
Microorganisme patogene, inclusiv <i>Salmonella</i> , în 25g produs	Nu s-a depistat				
<i>Proteus</i> în 1g produs	Nu s-a depistat				
Drojdii, în 1g produs	Nu s-a depistat				
Micromicete, în 1g produs	Nu s-a depistat				

Din datele tabelului 4.10 se observă, că pe parcursul termenului de cercetare caracteristicile organoleptice ale mostrelor de iaurt nu s-au înrăutățit în comparație cu nivelul inițial de fabricare.

Indicii fizico-chimici a mostrelor de iaurt practic nu s-au schimbat pe parcursul perioadei de cercetare (cu variații neînsemnate în limitele erorii admise) și corespund cerințelor documentelor în vigoare [24].

În rezultatul cercetărilor microbiologice ale mostrelor pe parcursul perioadei de păstrare, se poate afirma că nici într-o probă de iaurt nu au fost depistate microorganisme patogene, inclusiv bacterii coliforme, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, bacterii din genul *Proteus*. Drojdii și micete în mostrele de iaurt, la fel, nu au fost depistate pe parcursul perioadei cercetate.

Numărul de bacterii lactice în mostrele de iaurt, pe parcursul termenului de cercetare (5 puncte de control, 26 zile de păstrare) a rămas practic în limitele cerințelor normative - nu mai mic de 10^8 de celule bacteriene.

Cercetările privind determinarea termenului de valabilitate a iaurtului fabricat cu utilizarea culturilor starter autohtone au demonstrat, că fără utilizarea stabilizatorilor și altor aditivi alimentari calitatea iaurtului fabricat se păstrează la nivelul inițial timp de 20 zile [51]. Darea de seama privind termenul de păstrare este prezentat în Anexa 13.

4.5. Fezabilitatea economică a utilizării culturilor starter autohtone în procesul tehnologic de preparare a produselor lactate fermentate

Industria laptelui din Republica Moldova, fabricând produsele lactate, rezolvă două probleme importante. Prima constă în asigurarea populației țării cu produsele lactate și a doua – exportul produselor din lapte.

Culturile starter, obținute conform procedeelelor biotehnologice prin multiplicarea tulpinilor de bacterii lactice speciale, se utilizează practic în toate tehnologiile de prelucrare a laptelui, cu excepția fabricării laptelui praf și a untului.

În prezent, culturile starter sunt obiecte de import pentru diferite țări ale lumii. Din punct de vedere economic cheltuielile legate de import contribuie la majorarea prețului produsului finit.

Conform datelor statistice, în anul 2015 pe teritoriul Republicii Moldova au fost înregistrate 29 de întreprinderi de fabricare a produselor lactate, care produc 32 mii tone de lactate fermentate, volumul producerii cărora, comparativ cu anul 2010, a crescut cu 17,5% [1]. În rezultat crește și cererea de culturi starter.

Pentru a aprecia fezabilitatea economică a utilizării culturilor starter autohtone este necesar de a calcula costul unui concentrat bacterian elaborat.

Calculul costurilor se realizează după următoarele poziții:

1. Materii prime și materiale de bază.
2. Costurile de transport.
3. Materiale auxiliare.
4. Combustibil și energie pentru scopuri tehnologice.
5. Salariile de bază și suplimentare ale lucrătorilor de producție.
6. Alocațiile pentru nevoi sociale.
7. Cheltuieli de întreținere și funcționare a echipamentului.
8. Cheltuielile secției de producere.
9. Alte cheltuieli.

Costul materiei prime și a materialelor de bază este determinat de normele de consum de toate tipurile de materii prime pe unitate de produs finit, indicată în rețetă. Calcularea consumului, costului materiei prime și a materialelor de bază pentru fabricarea culturii starter pentru iaurt este prezentată în tab. 4.11 și 4.12.

Cheltuielile de transport includ costul de transport al materiei prime. Valoarea lor este calculată aproximativ 15-20% din costul materiei prime. Cheltuielile de transport reprezintă 11,6 lei.

Cheltuielile legate de combustibil și consumul de energie în scopuri tehnologice (energie electrică, apă etc.) sunt calculate în funcție normele relevante ale cheltuielilor de echipamente tehnologice în valoare de 15% din costul materiei prime și a materialelor de bază. Combustibilul și consumul de energie în scopuri tehnologice ajunge până la 11,6 lei.

Consumul materialelor auxiliare includ costul produselor chimice, textile, lubrifianți, containere, detergenți, echipamente, materiale de ambalare, care sunt necesare pentru producerea unei unități de producție. Calculul este prezentat în Tabelul 4.11.

Tabelul 4.11. Calcularea consumului materiei prime și materialelor de bază pentru obținerea 1 kg de concentrat bacterian

Materie primă și materiale	Consum, kg	Costul, lei
Mediul pe bază de lapte degresat hidrolizat	10,000	156,0
Cultivare, centrifugare	20kWt	50,0
Total		206,0

Tabelul 4.12. Calcularea consumului materiei prime și materialelor de bază pentru liofilizarea
1 kg concentrat bacterian

Materie primă și materiale	Consum, kg	Costul, lei
Lapte degresat	1,000	43
Glicerină	0,100	2,6
Zaharoză	0,075	1,76
Citrat de sodiu	0,025	1,0
Gelatină	0,025	11,2
Soluție tampon	0,275	15
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	0,0015	1,5
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0,0015	1,5
Total		77,56

Tabelul 4.13. Consumul materialelor auxiliare

Materiale auxiliare	Consum, buc	Prețul, lei	Costul, lei
Flacon	500	0,8	400,0
Plută	500	0,5	250,0
Capac aluminiu	500	0,5	250,0
Ambalaj de desfacere	50	1,0	50,0
Cutie	1	19	19,0
Total		38,86	969,0

Mărimea salariului de bază și suplimentar al lucrătorilor pe unitatea de producție este determinată prin extinderea la o rată de 8-15% din costul materiei prime și constituie până la 6,2 lei. Contribuțiile sociale includ următoarele taxe reținute: fondul social 23%, asigurare medicală 9%, fondul de pensii 6% și constituie 2,3 lei.

Cheltuielile pentru întreținerea și funcționarea echipamentului s-a determinat prin extinderea în mărime de 30-50% din fondul de salarii al lucrătorilor de producție și constituie 2,5 lei.

Cheltuielile legate de secția de producere includ costurile de amortizare, întreținere și reparare a instalațiilor de producție, costurile de gestionare și de întreținere a secției în ansamblu salariile de bază și suplimentare ale personalului, costul de protecție și securitate a muncii. Aceste costuri sunt în proporție de 40-50% din salariul lucrătorilor de producție și reprezintă 2,79 lei.

Cheltuielile de producere generale includ costurile de gestionare și organizarea producerii la întreprindere, cum ar fi salariile personalului de conducere, deplasări, cheltuielile de poștă și telefonie, formare a cadrelor, paza etc. Aceste cheltuieli sunt la o rată de 150-200% din salariul lucrătorilor de producție. Cheltuieli de producere generale constituie 10,85 lei.

Costul unitar de producție este definit ca sumă a tuturor acestor articole și constituie 1300,4 lei.

Costurile ocazionate în afara producției includ cheltuieli legate de vânzarea produselor finite și se calculează cu o extindere de 0,1-0,5% din costul de producție, ceea ce constituie până la 1 leu.

Costul total (sinecostul) include suma costurilor de producție și în afara producției și constituie 1301,4 lei.

Calculând costul total și stabilind nivelul de rentabilitate se poate calcula profitul și prețul en-gros al produsului.

Nivelul mediu de rentabilitate a întreprinderilor din industria alimentară este aproximativ de 15-25%. Astfel, câștigul estimat (C) se calculează după formula 4.1:

$$C = \frac{S \cdot R}{100}, \quad (4.1)$$

unde:

S – sinecostul produsului, lei;

R – nivelul de rentabilitate, %.

$$C = \frac{1301,4 \cdot 25}{100} = 325,1 \text{ lei}$$

Prețul en-gros se determină după formula 4.2.

$$P = S + C, \quad (4.2)$$

$$P = 1301,4 + 325,1 = 1626,5 \text{ lei}$$

Astfel, costul aproximativ a unui flacon (2 g) de concentrat bacterian pentru fabricarea iaurtului constituie 3,25 lei.

Prețul concentratului bacterian obținut, în medie, este mai ieftin comparativ cu cele prezente pe piață. De exemplu, cultura starter YO-Mix 883 destinată fabricării iaurtului și compusă din tulpinile *S. thermophilus* și *Lb. bulgaricus* costă 19,8 lei pentru 2 g de cultură [137].

- Calculul efectului economic rezultat din implementarea în circuitul economic a propunerii de fabricare a culturilor starter în comparație cu culturile starter provenite din import. Calculul efectului economic anual obținut datorită utilizării propunerilor de raționalizare se efectuează conform formulei următoare [24]:

$$E = \sum_{i=1}^k \Delta C_i \cdot S_i^n = \sum_{i=1}^k (C_i^b - C_i^n) \cdot S_i^n \quad (4.3)$$

unde:

E – efectul economic anual de la utilizarea propunerilor de raționalizare pe parcursul perioadei de gestiune, obținut din contul reducerii costului de producție a tuturor tipurilor noi de producție (lei);

ΔC_i – volumul reducerii costului de producție i -unității producției de tip nou (lei/kg);

S_i^n – volumul producției i -unității produselor de tip nou obținut în anul de gestiune (kg);

C_i^n și C_i^b – costul de producție al unei i -unități de producție de tip nou și, respectiv, producție-bază (lei/kg);

k – cantitatea tipurilor de producție nouă.

Astfel, în baza calculelor realizate, efectul economic la 1000 de flacoane fabricate conform prețurilor din anul 2017 va constitui:

$$E = (19,8 - 3,25) \cdot 1000 = 16\,550 \text{ lei}$$

4.6 . Concluzii la capitolul 4

1. Aplicarea metodei matematice de planificare a experiențelor a permis stabilirea compoziției optime a mediului de protecție pentru conservarea și păstrarea tulpinilor autohtone noi de *S. thermophilus*: glicerină (20%), zaharoză (10%), citrat de sodiu (10%) și gelatină (5%). [48].
2. Raportul optim al crioprotectorilor permeabili și celor impermeabili în componența mediului protector pentru conservarea în stare liofilizată a tulpinilor autohtone de streptococi lactici, contribuie la păstrarea viabilității și proprietăților biotehnologice ale culturilor. Culturile liofilizate în mediul protector optimizat revin la indicii productivi inițiali după 3 pasaje succesive pe mediul cu lapte degresat.
3. Tulpinile selectate sunt compatibile la asociere, iar includerea lor în asociațiile simbiote de rând cu specia *Lactobacillus bulgaricus*, a permis obținerea unor culturi starter multiple echilibrate destinate fabricării iaurtului. Culturile starter elaborate conțin 10^9 și 10^{10} CFU/ml de lapte degresat, formează coagul omogen și dens, fără eliminarea zerului, cu proprietăți organoleptice specifice iaurtului [4, 5, 6, 53].
4. Culturile starter producătoare de EPS posedă un efect pozitiv asupra mostrelor de iaurt fabricat în condiții industriale sporind viscozitatea și îmbunătățind proprietățile structurale ale iaurtului. Contribuția EPS-lor produse de *S. thermophilus* este foarte importantă mai ales la ameliorarea proprietăților fizico-chimice și caracteristicilor texturale ale laptelui degresat fermentat, comparativ cu probele care utilizează stabilizatori comerciali și culturi care nu produc EPS.

5. Iaurturile fabricate conform tehnologiei elaborate cu utilizarea culturilor starter autohtone își păstrează indicii de calitate la nivel inițial timp de 20 zile, fără utilizarea stabilizatorilor sau altor aditivi alimentari.
6. Implementarea tehnologiei de fabricare a culturilor starter autohtone, elaborate în cadrul lucrării date, asigură un cost de 6 ori mai mic per flacon de cultură starter, în comparație cu cele provenite din import.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Realizarea cercetărilor și analiza rezultatelor obținute în cadrul tezei de doctor „**Tulpini autohtone noi de *Streptococcus thermophilus* și utilizarea lor pentru fabricarea produselor lactate fermentate**” au condus la formularea următoarelor concluzii:

1. Tulpinile autohtone de bacterii lactice termofile izolate din lapte și produse lactate de fermentare spontană din diferite zone ale R. Moldova aparțin speciei *Streptococcus thermophilus*, conform rezultatelor identificării fenotipice și genotipice [4, 5, 6].
2. Tulpinile de *Streptococcus thermophilus*: CNMN-LB-50, CNMN-LB-51, CNMN-LB-52, CNMN-LB-53 și CNMN-LB-54 selectate pentru fabricarea produselor lactate fermentate posedă caracteristici biotehnologice valoroase, caracterizându-se prin activitate intensă de acidulare a laptelui și de formare a unui coagul omogen, compact și dens, ceea ce asigură consistența fermă a produselor [8].
3. Tulpinile selectate conțin 10^9 - 10^{10} UFC în 1 g de lapte fermentat și produc acid lactic în cantități suficiente pentru a inhiba creșterea microorganismelor patogene. Tulpinile manifestă activitate antagonistă față de *Escherichia coli* și față de *Staphylococcus aureus*, contribuind la prevenirea dezvoltării infecțiilor intestinale și a patogenilor în probele lactate fermentate [50, 54].
4. Utilizarea tulpinilor *Streptococcus thermophilus* CNMN-LB-50 și *Streptococcus thermophilus* CNMN-LB-51 producătoare de exopolizaharide (EPS) permite excluderea stabilizatorilor chimici din procesul tehnologic. Modificarea temperaturii de cultivare influențează durata fazelor de dezvoltare și randamentul producerii acestor metaboliți extracelulari. Pentru a stimula sinteza EPS în condiții industriale de fabricare a produselor lactate fermentate fără a modifica temperatura, mediul nutritiv trebuie suplimentat cu zaharoză în cantitate de 8%. [141].
5. Mediul protector determinat în baza metodei matematice de planificare a experiențelor conține cantități optime de glicerină (20%), zaharoză (10%), citrat de sodiu (10%), gelatină (5%), compoziție ce asigură viabilitatea bacteriilor lactice la nivel de 97% după liofilizare și menținerea proprietăților biotehnologice a culturilor pe o durată de păstrare îndelungată [48].

6. Asocierea culturilor în cadrul speciei *Streptococcus thermophilus*, precum și includerea lor în cadrul asociațiilor simbiote de rând cu specia *Lactobacillus bulgaricus*, permite obținerea unor culturi starter multiple echilibrate destinate fabricării iaurtului [4, 5, 6, 53].

Problema științifică importantă soluționată în lucrare. Au fost selectate și descrise tulpini noi de bacterii lactice din specia *S. thermophilus*, ceea ce a condus la elaborarea culturilor starter autohtone cu potențial biotehnologic înalt pentru industria de procesare a laptelui, fapt ce a permis eficientizarea procesului de fabricare a produselor lactate fermentate.

Aportul personal. În materialele care reflectă conținutul brevetelor de invenție autorului îi revine cota parte în corespundere cu lista autorilor. Toate celelalte rezultate obținute, analiza, generalizările și concluziile aparțin autorului

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Tulpinile de bacterii lactice de *Streptococcus thermophilus* CNMN LB – 50, CNMN LB – 51, CNMN LB – 52, CNMN LB – 53, CNMN LB – 54 cu proprietăți biotehnologice valoroase se *recomandă* pentru producerea industrială a culturilor starter destinate procesării laptelui la fabricarea produselor lactate fermentate cu conținut diferit de lipide;
2. Mediul optimizat pentru liofilizarea culturilor de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* se *recomandă* pentru depozitarea și păstrarea acestora în condiții de producere industrială;
3. Culturile starter elaborate, datorită competitivității și dezvoltării avantajoase în raport cu microflora nedorită în condițiile de fermentare, se *recomandă* pentru utilizare la scară industrială - în procesul de fabricare a iaurtului.

BIBLIOGRAFIE

În limba română

1. Anuarul Statistic al Republicii Moldova. Chișinău, 2016, p.410.
2. Banu C. Tratat de industria alimentară: probleme generale. București: Editura ASAB, 2008. 608 p.
3. Brevet de invenție MD 865, A23C 9/12, A23C 9/127, A23C 1/00, A23C 1/08, A23C 23/00, C12R 1/46, C12R 1/225. Procedeu de obținere a produsului lactat fermentat praf. Brevet de invenție de scurtă durată/ **Cartașev Anatoli**, BUREȚ Elena, COEV Ghenadii (MD). Cererea depusă 2014.06.30, BOPI nr. 1/2015.
4. **Cartașev A.** Tulpini autohtone noi de *Streptococcus thermophilus* și utilizarea lor pentru fabricarea produselor lactate fermentate. În: Ugal Invent Salonul Inovării și Cercetării, ediția a III-a, 19 – 20 Octombrie 2017, Galați, România. Catalog de invenții, p. 94-95.
5. **Cartașev A.**, Bureț E., Coev G. Procedeu de obținere a produselor lactate fermentate praf. În: Ugal Invent Salonul Inovării și Cercetării, ediția a III-a, 19 – 20 Octombrie 2017, Galați, România. Catalog de invenții, p. 85.
6. **Cartașev A.**, Bureț E., Coev G. Procedeu de obținere a produselor lactate fermentate praf. În: Catalog oficial al Expoziției Internaționale Specializate Infoinvent, 25-28 noiembrie 2015, Chișinău, p. 163-164.
7. **Cartașev A.**, Bureț E. Culturi de *Streptococcus thermophilus* producătoare de exopolizaharide. În: Materialele Simpozionului Științific Internațional „Agricultura Modernă – Realizări și Perspective”, vol. 34, Chișinău, Moldova, 2013, p. 409-412. ISBN 978-9975-64-246-0.
8. **Cartașev A.**, Bureț E. Caracteristica tehnologică a tulpinilor autohtone de *Streptococcus thermophilus*. În: Conferința tehnico-științifică a colaboratorilor, doctoranzilor și studenților, vol. 2, Chișinău, Moldova, 15-17 noiembrie, 2012, p. 35-38. ISBN 978-9975-45-251-9.
9. **Cartașev A.**, Bureț E. Culturi de bacterii lactice producătoare de exopolizaharide. În: Papers of the Sibiu Alma Mater University Conference „Challenges for Science and Research in the Crisis Era”, sixth edition, vol. 2, Sibiu, România, 28-30 martie, 2013, p. 103-106. ISSN 2067-1423.
10. **Cartașev A.**, Rudic V. Culturi starter de bacterii lactice termofile pentru produsele lactate fermentate. În: Buletinul academiei de științe a moldovei: științe vieții, 2016, 3(330), p. 156-163. ISSN 1857-064X.
11. Cerere de brevet de invenție nr. s 2017 0090. Procedul de obținere a concentratul bacterian uscat pentru fabricarea produselor lactate fermentate. / **Cartașev Anatoli**, Coev Ghenadii (MD). Cererea depusă 07.08.2017.

12. Cicala E.F. Metode de prelucrare statistică a datelor experimentale. Timișoara: Politehnica, 1999. 197 p.
13. Coev G., Bureș E., Șveș S., **Cartășev A.** Valorificarea genofondului autohton de bacterii lactice cu destinație industrială. În: Conferința științifico-practică internațională „Edificarea societății durabile”, Chișinău, Moldova, 2011, p. 209-213. ISBN 978-9975-64-221-7
14. Costin G. Produse lactate fermentate. Galați: Editura Academica, 2005, 384 p.
15. Florea T., Costin G. Polizaharide. Chimia alimentelor. Galați: Academica, 2001, vol. II, p. 393-450.
16. Giurgiulescu L. Procese și tehnologii în industria laptelui. Baia Mare: Universitatea de Nord, 2009. 260 p.
17. Guzun V., et al. Industrializarea laptelui. Chișinău: Tehnica-info, 2001. 488 p.
18. GOST 8.207-76 „Sistem de stat pentru asigurarea uniformității măsurătorilor. Măsurători directe cu observații multiple. Metode de prelucrare a rezultatelor observațiilor. Principii de baza” Moldova-Standard”, 1992, 8 p.
19. GOST 3624-92. Lapte și produse lactate. Metode titrimetrice pentru determinarea aciditate. Chișinău: Departamentului "Moldova-Standard", 1992, 10 p.
20. GOST 3626-73 Lapte și produse lactate. Metode de determinare a umidității și substanței uscate. Chișinău: Departamentului "Moldova-Standard", 1992, 10 p.
21. GOST 10444.12-88. Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов. Chișinău: Departamentului "Moldova-Standard", 1992, 6 p.
22. GOST 30518-97. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий). Chișinău: Departamentului "Moldova-Standard", 2000, 7 p.
23. GOST R 51455-99 Iaurt. Metoda potențimetrică de determinare acidității titrabile.
24. Hotărâre cu privire la Reglementarea Tehnică „Lapte și produsele lactate”. Nr. 611 din 05 iulie 2010. În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 13.07.2010, Nr. 119-120
25. Hotărârea nr. 221 cu privire la reguli privind criteriile microbiologice pentru produse alimentare din 16.03.2009. În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 24.03.2009, nr. 59-61, art. 272
26. Metodica determinării efectului economic sau al unui alt efect pozitiv obținut în urma utilizării propunerilor de raționalizare. Nr. 146 din 13.06.2003. În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 13.06.2003, nr. 116-120.
27. SM ISO 11870:2014. Lapte și produse lactate. Determinarea conținutului de grăsime. Linii directoare generale privind utilizarea metodelor butirometrice. Institutului Național de Standardizare, Chișinău, 2014, 16 p.

28. SM EN ISO 4833-1:2014. Microbiologia lanțului alimentar. Metoda orizontală pentru enumerarea microorganismelor. Partea 1: Tehnica de numărare a coloniilor la 30 °C prin metoda turnării în plăci. Chișinău: Institutul Național de Standardizare, 2014, 21 p.
29. SM EN ISO 6579-1:2017 Microbiologia lanțului alimentar. Metoda orizontală pentru detectarea, numărarea și tipizarea serologică a bacteriilor de genul Salmonella. Partea 1: Detectarea bacteriilor de genul Salmonella. Chișinău: Institutul Național de Standardizare, 2017, 65 p.
30. SM SR EN ISO 6888-2:2013. Microbiologia produselor alimentare și furajelor. Metodă orizontală pentru enumerarea stafilococilor coagulazo-pozitivi (Staphylococcus aureus și alte specii). Partea 2: Tehnică ce utilizează mediu de agar cu plasmă de iepure și fibrinogen. Chișinău: Institutul Național de Standardizare, 2013, 28 p.
31. SM SR ISO 15214:2014. Microbiologia produselor alimentare și furajelor. Metoda orizontală pentru numărarea bacteriilor acidolactice, mezofile. Tehnica numărării coloniilor la 30°C. Chișinău: Institutul Național de Standardizare, 2014, 15 p.
32. Vata C., Musca L., Segal R. Îndrumar de lucrări practice pentru biochimia produselor alimentare. Galati: „Dunarea de Jos” Foundation Publishing, 2000. 144 p.
33. Vassu T., Stoica I., Cstvak O., Mușat F., Genetica microorganismelor și Inginerie genetică microbiană. Note de curs și Tehnici de laborator. București:Petron, 2001, 256 p.

În limba engleză

34. Ale E.C., et al. Technological, rheological and sensory characterizations of a yogurt containing an exopolysaccharide extract from Lactobacillus fermentum Lf2, a new food additive. In: Food Research International, 2016, vol. 90, nr. 4, p. 259-267. DOI: [10.1016/j.foodres.2016.10.045](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.045)
35. Aldrete-Tapia A., et al. High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. In: Food Microbiology, 2014, vol. 44, p. 136-141.
36. Amaya O. M., et al. Microbial Biomass in Batch and Continuous System. Chapter 18. In: Biomass Now - Sustainable Growth and Use, Matovic M. D. Rijeka: InTech. 2013, p. 449-478. DOI:10.5772/55303.
37. Amiali N.M., Mulvey M.R., Berger-Bachi B., Sedman J., Simor A.E., Ismail A.A. Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy for the rapid identification of glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus. In: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, vol. 61, p. 95-102.
38. Aswathy R.G., Ismail B., John R.P., Nampoothiri K.M. Evaluation of the probiotic characteristics of newly isolated lactic acid bacteria. In: Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, vol. 151, nr. 2, p.244-255.

39. Ayala-Hernandez I., Goff H.D., Corredig M. Interactions between milk proteins and exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* observed by scanning electron microscopy. In: Journal of Dairy Science, 2008, vol. 91, nr. 7, p. 2583-90.
40. Bennama R., et al. Effect of fermentation conditions (culture media and incubation temperature) on exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* BN1. In: International Conference on Biology, Environment and Chemistry IPCBEE, vol. 24, 2011, Singapore, p. 433-437. ISSN: 2010-4618
41. Best B. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. In: Rejuvenation Research, 2015, vol. 18(5), p. 422–436.
42. Bhandari B., Bansal N., Zhang M., Schuck P. Handbook of Food Powders. Processes and Properties. Cambridge: Woodhead Publishing, 2013. 688 p.
43. Björkroth J., Koort J. Lactic Acid Bacteria: Taxonomy and Biodiversity. In: Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), 2011, Pages 45-48.
DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00255-7
44. Bottazi V. Functional fermented milks. New health benefit. In: Elite Communication Srl- Viale Teorico, 2006, p. 99.
45. Bureș E., **Cartășev A.**, Coev G. Improvement of textural properties of fermented milk by using *Streptococcus thermophilus* strains. În: International conference „Modern technologies in the food industry”, Chișinău, Moldova, 2012, p. 230-234. ISBN 978-9975-80-646-6.
46. Burgain J. Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. In: Advances in Colloid and Interface Science, 2013, vol. 213, p. 21-35.
47. Carafa I., Clementi F., Tuohy K. & Franciosi E. Microbial evolution of traditional mountain cheese and characterization of early fermentation cocci for selection of autochthonous dairy starter strains. In: Food Microbiology, 2016, vol. 53, p. 94–103.
48. **Cartășev A.** Optimization of a protective medium for freeze-dried strains of *Streptococcus thermophilus*. In: Young Scientist, 2017, vol. 46 (180), p.81-83. ISSN 2072-0297
49. **Cartășev A.** Effect of exopolysaccharide starter culture and solids on syneresis of yoghurt. În: International conference „Modern technologies in the food industry-2016”, Chișinău, Moldova, 20-22 october, 2016, p. 356-361. ISBN 978-9975-87-138-9.
50. **Cartășev A.** Antimicrobial activity of certain *Streptococcus thermophilus* strains isolated from spontaneous fermentation dairy products. În: Book of abstracts „Scientific conference of doctoral schools from UDJ Galati”, Galați, România, 4-5 june, 2015, p. 133-134.

51. **Cartasev A.** Yoghurt made by exopolysaccharide producing Moldavian origin strains of lactic acid bacteria. În: Journal of food and packaging: science, techniques and technologies, 2016, 9, p. 39-43. ISSN 1314-7773.
52. **Cartasev A., Bureș E.** Conservation method of strains of lactic acid bacteria. În: International Conference of young researches, ediția 9, Chișinău, Moldova, 11 octombrie, 2011, p. 13. ISBN 978-9975-4224-7-5.
53. **Cartasev A., Bureș E., Coev G.** Method for producing powdered fermented milk. În: Proceedings of the 9th edition of European Exhibition of Creativity and Innovation, Iași:StudIS,2017, p. 214. ISBN 978-606-775-212-0
54. **Cartasev A., Rudic V.** New *Streptococcus thermophilus* strain as potential agent for increasing bio-safety of dairy products. În: International scientific Conference on Microbial Biotechnology, 3rd edition, Chișinău, Moldova, october 12-13, 2016, p.96. ISBN 978-9975-3129-3-6.
55. **Cartasev A., Rudic V.** Effect of starter culture producing exopolysaccharide on yoghurt. In: Chemistry Journal of Moldova, 2017, Nr.12(2), p.7-12. ISSN 2345-1688 DOI: <http://dx.doi.org/10.19261/cjm.2017.440>
56. Cui Y., Xu T., Qu X., Hu T., Jiang X., Zhao C. New insights into various production characteristics of *Streptococcus thermophilus* strains. In: International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(10), p.1-17.
57. Cuthbertson L., et al. Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in Gram-negative bacteria. In: Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2009, vol. 73, p. 155–177.
58. Dan Li, Jiayi Li, Feng Zhao, Guohong Wang, Qianqian Qin, Yanling Hao. The influence of fermentation condition on production and molecular mass of EPS produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 in milk-based medium. In. Food Chemistry, 2016, vol. 197, p. 367–372.
59. Danisco Cultures. Choozit-Cheddar-Brochure. <http://www.orchard-dairy.co.uk/wp-content/uploads/2016/10/Choozit-Cheddar-Brochure.pdf> (vizitat 3.12.2017).
60. Davy M. A., O'Toole G.A. Microbial biofilm from ecology to molecular genetic. In: Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, vol. 64, p. 847-867.
61. Degeest B., Mozzi F., De Vuyst L. Effect of medium composition and temperature and pH changes on exopolysaccharide yields and stability during *Streptococcus thermophilus* LY03 fermentations. In: International Journal of Food Microbiology, 2002, vol. 79, p. 161–174.

62. Dimitrellou D., Kandylis P., Kourkoutas Y. Effect of cooling rate, freeze-drying, and storage on survival of free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393. In: LWT - Food Science and Technology, 2016, vol. 69, p. 468-473. DOI:10.1016/j.lwt.2016.01.063
63. DNeasy Blood & Tissue Handbook. Austin: QIAGEN, 2006. 62 p.
64. Dziuba B., Babuchowski A., Nalecz D., Niklewicz M. Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. In: International Dairy Journal, 2007, vol. 17, p. 183-189.
65. Elin S, Eine H, Xue Z, Zhennai Y, Goran W. Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* ST1 solely by NMR spectroscopy. In: Journal of Biomolecular NMR, 2010, vol.47, p. 125-134.
66. Faccia M., et al. Influence of the Milk Bactofugation and Natural Whey Culture on the Microbiological and Physico-Chemical Characteristics of Mozzarella Cheese. In: Journal of Food Process Technology, 2013, vol. 4, nr. 4, p.1-7.
67. Facklam R. What happened to the Streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. In: Clinical Microbiology Reviews, 2002, vol. 15, nr. 4, p. 613-630.
68. Feldmane J., Pavels S., Ciprovica I. Potential of exopolisaccharides in yoghurt production. In: International journal of agricultural, biosystems science and engeneering, 2013, vol. 7, nr. 8, p. 1-4.
69. Ferretti J, Köhler W. History of streptococcal research. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus Pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016.
70. Feutry F., Torre P., Arana I., Garcia S., Pérez Elortondo F.J. & Berthier F. Suitability of a new mixed-strain starter for manufacturing uncooked raw ewe's milk cheeses. In: Food Microbiology, 2016, vol. 56, p. 52–58.
71. Filomena F. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. In: Trends in Biotechnology, 2011, vol. 29, nr. 8, p. 388-398.
72. Frederick S.N. Molecular microbiology. Manual of clinical microbiology. 11-th edition. Washington: American Society for Microbiology, 2015. p. 54–90.
73. Griffiths M. W., Tellez A. M. *Lactobacillus helveticus*: The Proteolytic System. In: Frontiers in Microbiology, 2013, vol. 4, p. 1-9.
74. Han X., et al. Improvement of the texture of yogurt by use of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. In: BioMed Research International, 2016, p 2-6
75. Hayek S. A., Ibrahim S. A. Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. In: Food and Nutrition Sciences, 2013, vol. 4, p. 73-87. [DOI:10.4236/fns.2013.411A010](https://doi.org/10.4236/fns.2013.411A010)

76. Hayes M., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Stanton C. Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: overview. In: *Biotechnology Journal*, 2007, vol. 2, p. 426–434.
77. Hickey CD, Sheehan JJ, Wilkinson MG, Auty MAE. Growth and location of bacterial colonies within dairy foods using microscopy techniques: a review. In: *Frontiers in Microbiology*, 2015, vol. 6(99), p. 1-9. doi:10.3389/fmicb.2015.00099.
78. ISO 9232-2003 Yogurt — Identification of characteristic microorganisms (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*). Geneva:International Organization for Standardization, 2003, 17 p.
79. Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (). Role of the normal gut microbiota. In: *World Journal of Gastroenterology*, 2015, vol.21, pp. 8787–8803.
80. Jaruwan Chutrtong. Survival of probiotic bacteria in freeze – dry yogurt starter cultures storage at 4 and 30 degree celsius. In: *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 2015, vol. 191, pp. 2219 – 2225.
81. Juillard V., Le Bars D., Kunji E.R.S., Konings W.N., Gripon J.C., Richard J. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. In: *Applied Environmental Microbiology*, 1995, vol. 61, p. 3024–3030.
82. Karen C.C., Robin P. Systems for identification if bacteria and fungi. *Manual of clinical microbiology*. 11-th edition. Washington: American Society for Microbiology, 2015. p. 29–43.
83. Kongo J. M. Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. Chapter 1. Rijeka: Intech, 2013. p. 1-22.
84. Lancefield, R. A serological differentiation of human and other groups of streptococci. In: *The Journal of Experimental Medicine*, 1933, nr. 59, p. 441–158.
85. Laws A., Gu Y., Marshall V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. In: *Biotechnology Advances*, 2001, vol. 19, issue 8, p. 597-625. DOI: 10.1016/S0734-9750(01)00084-2
86. Lee W. J., Lucey J. A., Singh H. Formation and physical properties of yogurt. In: *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2010, vol. 23, nr. 9, p. 1127-1136.
87. Lejkova J., et.al. Isolation of autochthonous lactic acid bacteria from ewes' lump cheese, bryndza cheese and barrelled ewes' cheese, and their characterization using Fourier transform infrared spectroscopy. In: *Journal of Food and Nutrition Research*, 2015, vol. 54, Nr. 4, pp. 308–313.

88. Letort C., Juillard V. Development of a minimal chemically defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. In: *Applied Environmental Microbiology*, 2001, vol. 91, p. 1023–1029.
89. Lin T.Y., Chang Chien M.-F. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. In: *Food Chemistry*, 2007, vol. 100, issue 4, p. 1419-1423. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.11.033.
90. Liu M., Bayjanov J. R., Renckens B., Nauta A., Siezen R. J. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. In: *BMC Genomics*, 2010, vol. 15, p. 11–36.
91. Luo C., Deng S. Viili as Fermented Food in Health and Disease Prevention: A Review Study. In: *Journal of Agricultural Science and Food Technology*, 2016, vol. 2 (7), p. 105-113.
92. MacKay L.L. Functional properties of plasmids in lactic streptococci. In: *Antonie van Leeuwenhoek*, 1983, vol.49, nr..2, p.259 – 274.
93. Mark E. Johnson. Mesophilic and thermophilic cultures used in traditional cheesemaking. In: *Microbiology Spectrum*, 2013, vol. 1, nr. 1, p. 1-18.
94. Mauer L.J., Reuhs B.L. Mid-Infrared sensors for the rapid analysis of select microbial food borne pathogens Voeller JG, ed. *Wiley Handbook of Science and Technology for Homeland Security*. New York: Wiley, 2010. 2888 p.
95. Mezaini A., Chihib N.E., Dilmi Bouras A., Nedjar-Arroume N., Pierre Hornez J. Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product. In: *Journal of Environmental and Public Health Volume 2009*, Article ID 678495, 6 p.
96. Moraes P.M., Perin L.M., Júnior A.S., Nero L.A. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. In: *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013, Nr. 44, vol.1, p. 109-112. DOI:10.1590/S1517-83822013000100015.
97. Morelli L.. Yogurt, living cultures, and gut health. In: *American Journal of Clinical Nutrition*, 2014, vol. 99 (suppl), p. 1248S–50S.
98. Motta A. S., Mesquita Gomes M. S. Technological and functional properties of lactic acid bacteria: the importance of these microorganisms for food. In: *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 2015, vol. 70, nr. 3, p. 172-184. DOI: 10.14295/2238-6416.v70i3.403
99. Mouwen D.J.M., et al. Applying Fourier-transform infrared spectroscopy and chemometrics to the characterization and identification of lactic acid bacteria. In: *Vibrational Spectroscopy*, 2011, vol. 56, p. 193-201. DOI: [10.1016/j.vibspec.2011.02.008](https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2011.02.008)

100. Naumann D., Helm D., Labischinski H., Giesbrecht P. The Characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). *Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis*. New York: VCH, 1991. p. 43- 96.
101. Oliveira M. N. Fermented Milks and Yogurt. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2nd Edition, vol. 1, 2014, p. 908-922. DOI:10.1016/B978-0-12-384730-0.00121-X
102. Orchard valley dairy supplies. Cultures for stirred yogurt. <https://www.orchard-dairy.co.uk/product-category/cultures-for-yogurt/stirred-yoghurt-production/> (vizitat 3.12.2017).
103. Parente E., Cogan T. M., Powell I. B. Starter Cultures: General Aspects. Chapter 8. *Cheese* (Fourth edition). Ed. McSweeney P. L.H., Amsterdam: Elsevier. 2017. p. 201–226.
104. Pat. 2004077056, United States. Int. Cl. C12R1/01, C12N15/01, C12N1/20, C08B37/00, C12P19/04. Production of exopolysaccharides unattached to the surface of bacterial cells. Motohide Y., Armentrout R.W., Mikolajczak M., T.J. Pollock. Pub. Date Apr. 22.2004.
105. Pat. 20130337108 United States, Int. Cl. A23L29/00, C12N1/04, A23C9/123. Starter culture compositions. Pim Van Hee; Assignee: Dsm Ip Assets B.V. Pub. Date. Dec. 19, 2013.
106. Prasanna P.H.P., Grandison A.S., Charalampopoulos D. Microbiological, chemical and rheological properties of low fat set yoghurt produced with exopolysaccharide (EPS) producing Bifidobacterium strains. In: *Food Research International*, 2013, vol. 51, p. 15–22. DOI: [10.1016/j.foodres.2012.11.016](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.016)
107. Rabha B., et al. Influence of Lactose and Sucrose on Growth and Acetaldehyde production by three strains of *Streptococcus thermophilus*. In: *International conference on applied life science*, Turkey, 10-12 september, 2012, p. 223-228.
108. Rabha B., et al. Effect of some fermentation substrates and growth temperature on exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* BN1. In: *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2012, vol. 2(1), p.44-47.
109. Reginensi S.M., González M.J., Bermúdez J. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from cow, ewe and goat dairy artisanal farmhouses. In: *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013, vol. 44, nr.2, p. 427-430. DOI:10.1590/S1517-83822013000200013.
110. Rybak O. The role of milk proteins in the structure formation of dairy products. In: *Ukrainian Food Journal*, 2014, vol. 3, nr. 3, p. 350-360.
111. Schaechter M. *Desk Encyclopedia of Microbiology*. 2nd Edition. Amsterdam: Elsevier, 2010. 1259 p.
112. Tamime A. Y., Robinson R. K. *Tamime and Robinson's Yoghurt: Science and Technology*. Third edition. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2007. 488 p.

113. Tapan S. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Production, Isolation and Applications. In: IOSR Journal of Pharmacy, 2012, vol. 2, nr.2, p. 276-281. DOI : 10.9790/3013-0220276281
114. Theophanies T. Infrared spectroscopy – materials science, engineering and technology. Rijeka: Intech. 2012. 511 p.
115. Tidona F., et al. Selection of *Streptococcus thermophilus* strains able to produce exopolysaccharides in milk. In: International Journal of Dairy Technology, 2016, vol. 69, p. 1-7. DOI: 10.1111/1471-0307.12295
116. Tsakalidou E., Zoidou E., Pot B., Wassill L., Ludwig W., Devriese L.A., Kalantzopoulos G., Schleifer K.H., Kersters K. Identification of streptococci from Greek Kasseri cheese and description of *Streptococcus macedonius* sp. nov. In: International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, vol. 48, nr. 1, p. 519-527.
117. Umamaheswari T., et. al. *Streptococcus thermophilus* strains of plant origin as dairy starters: Isolation and characterization. In: International Journal of Dairy Technology, 2013, vol. 66, p. 1 - 6. DOI: 10.1111/1471-0307.12098.
118. Uriot O. et al. *Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate? In: Journal of Functional Foods, 2017, nr. 37, p. 74-89.
119. Wenning M., Scherer S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. In: Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, vol. 97, p. 7111–7120.
120. Werning M. L., et al. Biosynthesis, Purification and Biotechnological Use of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. Chapter 5. In: Food Additive. Ed. Yehia El-Samragy, 2012. p. 83-114
121. Whitman, W. B. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. New Jersey: Wiley, 2015.
122. Wolkers W. F., Oldenhof H. Cryopreservation and Freeze- Drying Protocols. Third Edition. Hannover: Humana Press, 2015. 505 p.
123. Woo, P. C. Y., et al. Then and now: use of 16S rDNA sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. In: Clinical Microbiology and Infection, 2008, vol. 14, p. 908-934.
124. Wu Q., el al. Genomic insights into high exopolysaccharide-producing dairy starter bacterium *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. In: Scientific Reports, 2014, vol. 4, p. 1-8.
125. Yuksekdag Z. N., Aslim B. Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus*

- thermophilus (W22). In: Brazilian Archives of Biology and Technology, 2008, vol. 51, nr. 3, p.581-585.
126. Zacharof M. P., Lovitt R. W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. In: APCBEE Procedia, 2012, vol. 2, p. 50-56.
 127. Zeki Berk. Food Process Engineering and Technology. 2nd Edition. Academic Press. 2013. 720 p.
 128. Zhang L., et al. Effect of exopolysaccharide-producing starter cultures and post-fermentation mechanical treatment on textural properties and microstructure of low fat yoghurt. In: International Dairy Journal, 2016, nr. 53, p. 10-19.
 129. Zhang T., Zhang C., Li S., Zhang Y., Yang Z. Growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST1 in skim milk. In: Brazilian Journal of Microbiology, 2011, vol. 42(4), p. 1470-1478. DOI:10.1590/S1517-838220110004000033.
- În limba rusă*
130. Бактериальные закваски для промышленности. <http://instmmp.by/pages/2375> (vizualizat 02.02.2018).
 131. Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства. Москва: Агропромиздат, 1987. с. 112-147.
 132. Биргер М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. Москва: Медицина, 1982. 461 с.
 133. Горбатова К. К. Физико-химические и биохимические основы производства молочных продуктов. Санкт Петербург: ГИФД, 2004. 352 с.
 134. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов: учебник. Москва: Колос, 1997. 288 с.
 135. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.
 136. Егоров Н. Основы учения об антибиотиках. Москва: Наука, 2004, 528 с.
 137. Закваска YO-MIX 883 LYO 50 DCU
<http://www.saksavorst.ee/ru/product/%D0%B7%D0%B0%D0%BA%D0%B2%D0%B0%D1%81%D0%BA%D0%B0-yo-mix-883-lyo-50-dcu/> (vizitat 27.06.2017)
 138. Ильин Д. Ю., Ильина Г. В. Основы переработки сельскохозяйственной продукции. Пенза: РИО ПГСХА, 2016. 115 с.
 139. **Карташев А.** Идентификация местных штаммов *Streptococcus thermophilus* с использованием инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье. В: Сборник тезисов III международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биотехнологов и вирусологов, Новосибирск, Россия, 2017, с. 239-242. ISBN 978-5-4437-0687-0

140. **Карташев А.**, Бурец Е., Коев Г., Богдан Н. Штаммы молочнокислых бактерий с перспективными для молочной промышленности биотехнологическими свойствами. В: Вестник Уральской медицинской академической науки, пг. 4/1 (38), Екатеринбург, 2011, с. 80-81. ISSN 2073-9125.
141. **Карташев А.**, Коев Г. Влияние условий культивирования на биосинтез экзополисахарида штаммом *Streptococcus thermophilus* LB-50. В: Сборник тезисов III международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биотехнологов и вирусологов, Новосибирск, Россия, 2016, с. 41-45. ISBN 978-5-4437-0563-7
142. Красникова Л.В, Гунькова П.И. Микробиология молока и молочных продуктов: методические указания к лабораторным работам для студентов, обучающихся по специальности 260303.65 (271100) всех форм обучения. Санкт-Петербург: СПбГУНиПТ, 2006. 63 с.
143. Кисленко В.Н. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. Москва: КолосС, 2005. 232 с.
144. Крусь Г.Н. Методы исследования молока и молочных продуктов. Москва: Колос, 2000. 368 с.
145. Методические Указания МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. В: Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия, 2004, Т.6, №4, с.306-359.
146. Методические Указания МУК 4.2.1847-04 Методические указания. Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условия хранения пищевых продуктов. ГУ НИИ питания Российской академии медицинских наук. п. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические методы. 2004, 16 с.
147. Меркулова Н. Г. Подбираем заквасочные культуры. В: Переработка молока, 2014, № 3, с. 28-30.
148. Несчислаев В. А. Универсальная защитная среда для лиофилизации пробиотических препаратов. В: Казанский медицинский журнал, 2010, vol.91, nr.1, p. 122-124.
149. Пат. 2112387 Российская Федерация, МПК A23C 9/12, C12N 1/20. Способ производства сухого бактериального концентрата для кисломолочного продукта. И. Ю. Ильницкая, И.В. Куликова, Т.Н. Токинова; Патентооблад. Общество с ограниченной ответственностью Фирма "Фермент". Заявка 04.04.1997.
150. Пат. 2371479 Российская Федерация, МПК C12N 11/00, A61K 35/74. Комплексный препарат-пробиотик в иммобилизованной и лиофилизированной форме. А. В.

- Молокеев и др.; Патентооблад. Закрытое акционерное общество "Вектор-БиАльгам".
Опубл. 27.10.2009, Бюл. № 30.
151. Пат. 2473360 Российская Федерация, МПК А61К38/00, А61К 9/08. Белковые композиции и способы их получения. Фраунхофер В. и др.; Патентооблад. Эббот Лэборетриз. Опубл. 27.01.2013, Бюл. № 1.
152. Пат. 2607023 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А23С 9/12, С12R 1/46. Сухая бактериальная закваска для производства кисломолочных продуктов и способ ее получения. Д. Л. Черников; Общество с ограниченной ответственностью "Зеленые линии". Опубл. 10.01.2017, Бюл. № 1.
153. Р 50.1.037-2002 Прикладная статистика. Правила проверки согласия опытного распределения с теоретическим. Часть II. Непараметрические критерии. Госстандарт России:Москва, 60 с.
154. Рамонова Э. Выделение и идентификация местных штаммов молочнокислых микроорганизмов и их использование в качестве пробиотиков. Диссер. канд. биол. наук. Владикавказ, 2011. 191 стр.
155. Рогов Г.Н. Разработка технологии производства и способов применения бактериальных концентратов мезофильных молочнокислых бактерий с целью улучшения качества мелких сычужных сыров. Автореф. дис. канд. техн. наук. Углич, 1994. 24 с.
156. Сборник инструкций по селекции молочнокислых бактерий и бифидобактерий и подбору заквасок для кисломолочных продуктов. Москва: ВНИИМС, 1986, 100 с.
157. Семенов Г. В. Вакуумная сублимационная сушка. Москва: ДеЛи плюс, 2013. 264 с.
158. Смирнова И.А. Кисломолочные напитки с медом. В: Молочная промышленность, 2007, №10, с. 76-77.
159. Снятковский М.В. Закваски прямого внесения фирмы «Хр. Хан-сен» для производителей кисломолочных продуктов в России. В: Молочная промышленность, 2004, №10, с. 30-31.
160. Соколова О. Заквасочные культуры для производства сметаны. В: Молочная промышленность, 2012, №4, с.75.
161. Соловьева Е.А. Новые заквасочные культуры для кисломолочных продуктов и сыров. В: Молочная промышленность, 2005, №9, с. 14 – 15.
162. Степаненко, П.П. Микробиология молока и молочных продуктов: учебник для вузов. Сергиев Посад.: ООО «Все для Вас-Подмосковье», 1999. 415 с.
163. Столярова, А.С. Разработка лиофилизированных препаратов бифидобактерий. Автореф. дис. канд. техн. наук. Улан-Удэ, 1995. 22 с.

164. Твердохлеб Г.В. Химия и физика молока и молочных продуктов. Москва: ДеЛипринт, 2006. 360 с.
165. Тихомирова Н.А. Технология продуктов функционального питания. Москва: ООО «Франтера», 2002. 213 с.
166. Хамагаева И. С., Качанина Л. М., Тумурова С. М. Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий. Улан-Удэ: Издательство ВСГТУ, 2006. 172 с.
167. Хвыля С. И. Научно-методические рекомендации по микроструктурному анализу мяса и мясных продуктов. Москва: РАСХН, 2002. 40 с.
168. Шидловская В.П. Органолептические свойства молока и молочных продуктов: Справочник. Москва: Колос, 2000. 280 с.
169. Яркина Я. А. Разработка технологии бактериального концентрата бифидобактерий *Lactobacillus casei*. Автореф. дис. канд. техн. наук. Москва, 2005. 26 с.

ANEXE

CERTIFICAT

de efectuare a stagiului de doctorat la Food Research Institute, Slovacia.



NÁRODNÉ POĽNOHOSPODÁRSKE
A POTRAVINÁRSKE CENTRUM
VÝSKUMNÝ ÚSTAV POTRAVINÁRSKY
BRATISLAVA

To whom it may concern:

I, undersigned RNDr. Tomáš Kuchta, DrSc., Head of Department of Microbiology,
Molecular Biology and Biotechnology of Food Research Institute NPPC,

Declare

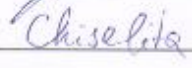
that Anatoli Cartășev, from Republic of Moldova, worked at Department of Microbiology,
Molecular Biology and Biotechnology of Food Research Institute NPPC (National
Agricultural and Food Centre, Bratislava, Slovakia) from 1st November 2016 to 31st
January 2017 (3 months) making progress on screening of *Streptococcus thermophilus*
strains isolated from milk and dairy products of spontaneous fermentation from Republic
of Moldova. I appreciate his great research abilities and independence in planning and
managing the laboratory facilities even totally new for him. He showed great ability
working in team and to be suitable to adapt to new environment. He is self confident,
clever and motivated and able to effectively perform using current state-of-the-art
methodologies in the laboratories of our department. We find his activities positive and
useful, having a considerable scientific merit, and expect a good research prospect for
Mr. Cartășev.

Sincerely,

Tomáš Kuchta
Head of Department of Microbiology, Molecular
Biology and Biotechnology
Food Research Institute NPPC
Bratislava
Slovakia

Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum | Výskumný ústav potravinársky Bratislava
Priemyselná 4, P.O.Box 25, 824 75 Bratislava | IČO: 42337402
tel.: +421255574622 | fax: +421255571417
www.nppc.sk | vup@vup.sk

Adeverințe de depozitare a tulpinilor autohtone noi de *Streptococcus thermophilus*

 INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL A.Ș.M. COLECȚIA NAȚIONALĂ DE MICROORGANISME NEPATOGENE str. Academiei, 1, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova, Tel. (373 22) 73 96 09, e-mail: imbcnmn@yahoo.com	
ADEVERINȚĂ DE DEPOZITARE	
Cartășev A., Bureș E., Căev G. (numele, prenumele)	
Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare (denumirea organizației)	
str. Vierul 59, MD-2070, or. Codru, mun. Chișinău, Republica Moldova (adresa deponentului)	
<i>Streptococcus thermophilus</i> -	
destinată utilizării în compoziția culturilor starter pentru fabricarea iaurtului, laptelui covășit (Genul, specia și destinația tulpinii)	
Numărul de înregistrare, invocat tulpinii depozitate de către Colecție: <u><i>Streptococcus thermophilus</i> CNMN-LB-50</u>	
Data depozitării: 07.04.2014	
<u>Adresa și denumirea colecției:</u> str. Academiei 1, MD-2028, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene (CNMN), Chișinău, Republica Moldova Tel.: (+373 22) 73 96 09 E-mail: imbcnmn@yahoo.com Web: www.imb.asm.md	
Directorul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie, academician, profesor universitar Șef al CNMN, doctor în biologie,	 V. Rudic  O. Chiselita



**INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE
ȘI BIOTEHNOLOGIE AL A.Ș.M.
COLECȚIA NAȚIONALĂ DE MICROORGANISME NEPATOGENE**

str. Academiei, 1, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova, Tel. (373 22) 73 96 09, e-mail: imbcnmn@yahoo.com

ADEVERINȚĂ DE DEPOZITARE

Cartașev A., Bureș E., Coev G.

(numele, prenumele)

Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare

(denumirea organizației)

str. Vierul 59, MD-2070, or. Codru, mun. Chișinău, Republica Moldova

(adresa deponerului)

Streptococcus thermophilus -

destinată utilizării în compoziția culturilor starter
pentru fabricarea iaurtului, laptelui covășit

(Genul, specia și destinația tulpinii)

Numărul de înregistrare, invocat tulpinii
depozitate de către Colecție:

Streptococcus thermophilus CNMN-LB-51

Data depozitării: 07.04.2014

Adresa și denumirea colecției:

str. Academiei 1, MD-2028, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie,
Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene (CNMN),
Chișinău, Republica Moldova
Tel.: (+373 22) 73 96 09
E-mail: imbcnmn@yahoo.com
Web: www.imb.asm.md

Directorul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie,
academician, profesor universitar

Șef al CNMN, doctor în biologie,



V. Rudic

O. Caiselița

CNMN INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE
 ȘI BIOTEHNOLOGIE AL A.Ș.M.
COLECȚIA NAȚIONALĂ DE MICROORGANISME NEPATOGENE
 str. Academiei, 1, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova, Tel. (+373 22) 73 96 09, e-mail: imbcnmn@yahoo.com

ADEVERINȚĂ DE DEPOZITARE

Cartășev A., Bureș E., Coev G.

(numele, prenumele)

Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare

(denumirea organizației)

str. Vierul 59, MD-2070, or. Codru. mun. Chișinău, Republica Moldova

(adresa deponentului)

Streptococcus thermophilus -

destinată utilizării în compoziția culturilor starter
 pentru fabricarea iaurtului, laptelui covășit, brânzei și smântinii

(Genul, specia și destinația tulpinii)

Numărul de înregistrare, invocat tulpinii
 depozitate de către Colecție:

Streptococcus thermophilus CNMN-LB-52

Data depozitării: 07.04.2014

Adresa și denumirea colecției:

str. Academiei 1, MD-2028, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie,
 Colecția Națională de Microorganisme Nепatogene (CNMN),
 Chișinău, Republica Moldova
 Tel.: (+373 22) 73 96 09
 E-mail: imbcnmn@yahoo.com
 Web: www.imb.asm.md

Directorul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie,
 academician, profesor universitar

Șef al CNMN, doctor în biologie,



 V. Rudic

 O. Chiselița

CNMN

**INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE
ȘI BIOTEHNOLOGIE AL A.Ș.M.
COLECȚIA NAȚIONALĂ DE MICROORGANISME NEPATOGENE**

str. Academiei, 1, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova, Tel. (+373 22) 73 96 09, e-mail: imbcmn@yahoo.com

ADEVERINȚĂ DE DEPOZITARE

Cartășev A., Bureș E., Coev G.

(numele prenumele)

Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare

(denumirea organizației)

str. Vieru, 59, MD-2070, or. Codru, mun. Chișinău, Republica Moldova

(adresa deponentului)

Streptococcus thermophilus -

destinată utilizării în compoziția culturilor starter
pentru fabricarea iaurtului, laptei coagulat, brânze și smântână

(Genul, specia și destinația tulpinii)

Numărul de înregistrare, invocat tulpinii
depozitate de către Colecție:

Streptococcus thermophilus CNMN-LB-53

Data depozitării: 07.04.2014

Adresa și denumirea colecției:

str. Academiei I, MD-2028, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie,
Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene (CNMN),
Chișinău, Republica Moldova
Tel.: (+373 22) 73 96 09
E-mail: imbcmn@yahoo.com
Web: www.imb.asm.md

Directorul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie,
academician, profesor universitar

Șef al CNMN, doctor în biologie,



[Signature]
Chiselita

V. Rudic

O. Chiselita

CNMN INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE
 ȘI BIOTEHNOLOGIE AL A.Ș.M.
COLECȚIA NAȚIONALĂ DE MICROORGANISME NEPATOGENE
 str. Academiei, 1, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova, Tel. (373 22) 73 96 09, e-mail: imbcmn@yahoo.com

ADEVERINȚĂ DE DEPOZITARE

Cartășev A., Bureș E., Coev G.

(numele, prenumele)

Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare

(denumirea organizației)

str. Vierul 59, MD-2070, or. Codru, mun. Chișinău, Republica Moldova

(adresa deponentului)

Streptococcus thermophilus ST-109(12) -

destinată utilizării în compoziția culturilor starter
 pentru fabricarea iaurtului, laptelui covășit, brânzei și smântinii

(Genul, specia și destinația tulpinii)

Numărul de înregistrare, invocat tulpinii
 depozitate de către Colecție:

Streptococcus thermophilus CNMN LB-54

Data depozitării: 07.04.2014

Adresa și denumirea colecției:

str. Academiei I, MD-2028, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie,
 Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene (CNMN),
 Chișinău, Republica Moldova
 Tel.: (+373 22) 73 96 09
 E-mail: imbcmn@yahoo.com
 Web: www.imb.asm.md

Directorul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie,
 academician, profesor universitar

Șef al CNMN, doctor în biologie,



[Signature] V. Rudic
[Signature] O. Chiselița

Proces verbal de fabricare a loturilor experimentale de bacterii lactice (5 tulpini) din specia
Streptococcus thermophilus

ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
MINISTERUL AGRICULTURII ȘI INDUSTRIEI ALIMENTARE
INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO - PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII
ALIMENTARE

APROB

Director general al IȘP de Horticultură și
Tehnologii Alimentare
dr. hab. DADU C.



PROCES VERBAL DE PRODUCERE

Nr. 2 din 9 februarie 2013

Chișinău, IP IȘPHTA

Noi, subsennații: șef de laborator Ghenadie COEV, cercetători științifici Elena BUREȚ, Anatoli CARTAȘEV, Valentina LAZAREVA, am întocmit acest proces verbal, confirmând, că în Laboratorul de biotehnologii alimentare în perioada de 23 ianuarie – 8 februarie 2013 au fost fabricate loturi experimentale de bacterii lactice din specia *Streptococcus thermophilus* (5 tulpini) izolate din lapte și produsele lactate de fermentare spontană din diferite regiuni ale RM.

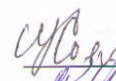
Au fost investigate indiciile organoleptici, fizico-chimici și microbiologici.

Mostrele fabricate au fost puse la păstrare (-18 °C) în Laboratorului de biotehnologii alimentare.

Caracteristicile mostrelor de tulpini liofilizate sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Caracteristicile tulpinilor *S. thermophilus* liofilizate

caracteristici	Tulpini de <i>Streptococcus thermophilus</i>				
	CNMN-LB-50	CNMN-LB-51	CNMN-LB-52	CNMN-LB-53	CNMN-LB-54
Aspect exterior	Forma de pastilă, întreagă de culoare galbuie				
Fracție masică de umiditate, %	3,1±0,1				
Titrul de bacterii lactice, UFC/ml	10 ⁹				

 Coev G.
 Cartășev A.
 Bureț E.
 Lazareva V

Referința
solicitantului/
reprezentantului
Nr.:
Data:

Se completează de către AGEPI	
Registratura AGEPI intrare Nr.: 1682 Data: 2017-08-07 10:41:46	Registrul Național de Cereri de Brevet de Invenție de scurtă durată (21) Nr. depozit s 2017 0090 (22) Data depozit 07-08-2017 16:14:10

Str. Andrei Doga nr. 24, bloc 1, MD-2024, Chişinău, Republica Moldova,
tel.: (37322) 40-05-05, fax 43-85-08

I. (71) SOLICITANT (nume, prenume sau denumire completă, adresă, telefon și fax cu prefixul zonei, e-mail) Instituție Publică IȘPHTA, Vieru 59, MD-2070, CODRU, CHIȘINĂU Mun., tel. 068169206 ☒ persoană juridică ☐ persoană fizică	Numărul de identificare de stat unic(IDNO/IDNP) 1008600056226 Cod țară conform normei ST.3 OMPI MD
II. (74) REPREZENTANT (nume, prenume sau denumire completă, adresă, telefon și fax cu prefixul zonei și nr. procurii) Persoana indicată este desemnată să acționeze în fața AGEPI în calitate de: ☒ mandatar autorizat ☐ reprezentant ☐ reprezentant comun al solicitanților ☒ procură ☐ procură generală nr./data	
III. (74) ADRESA PENTRU CORESPONDENȚĂ (nume, prenume, adresă, telefon și fax cu prefixul zonei) Alexandru Rudoi, CHIȘINĂU Mun., CODRU, Vieru 59 MD-2070, tel 068169206	
IV. SOLICIT(ĂM) în baza Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor (Lege) acordarea unui brevet de invenție pentru invenția cu: (54) TITLUL: Procedeu de obținere a concentratului bacterian uscat pentru fabricarea produselor lactate fermentate Solicitantului îi aparține dreptul la brevet în baza ☒ art. 14 alin. 1, ☐ art. 15 alin. 2, ☐ art. 15 alin. 3, ☐ art. 15 alin. 4 din Lege, sau ☐ în baza a unui acord încheiat la data de	
V. (30) PRIORITATE REVENDICATĂ: (31) Nr. (32) data (33) țara (23) denumirea expoziției: data țara	
VI. REFERINȚĂ LA O CERERE ANTERIOARĂ: (nr. depozit, data depozit, țara/oficiul)	
VII. (62) CEREREA este DIVIZIONARĂ din cererea cu nr. data	
VIII. DECLAR(ĂM) că INVENTATORUL(II) este (sunt): ☒ a) același (aceiași) cu SOLICITANTUL(ȚII) ☐ b) persoana(ele) jos menționată(e)	
IX. DOCUMENTE DEPUSE:	



DIRECȚIA BREVETE



PATENTS DEPARTMENT

IDNO 1015601000112

nr. _____
din _____

RUDOI Alexandru,
str. Vieru nr. 59, Codru, Chișinău,
MD-2070, Republica Moldova

HOTĂRÂRE

nr.8973 din 2018.03.06

În urma examinării dosarului cererii de brevet de invenție de scurtă durată:

- (21) Nr. depozit: s 2017 0090
(22) Data depozit: 2017.08.07
(54) Titlul: **Procedeu de obținere a maielei bacteriene uscate pentru fabricarea produselor lactate fermentate**

și în temeiul art. 52(3) din Legea nr. 50/2008 privind protecția invențiilor, Direcția Brevete, Secția Examinare

HOTĂRĂȘTE

Acordarea brevetului de invenție de scurtă durată conținând următoarele date:

- (13) Y
(51) **Int.Cl:** *C12N 1/04* (2006.01) *C12R 1/46* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01) *A23C 9/12* (2006.01)
A23C 1/08 (2006.01)
(21) s 2017 0090
(22) 2017.08.07
(71)(73) INSTITUȚIA PUBLICĂ INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE
HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII ALIMENTARE, MD
(72) CARTAȘEV Anatoli, MD; COEV Ghenadii, MD
(54) **Procedeu de obținere a maielei bacteriene uscate pentru fabricarea produselor lactate fermentate**
(57) **Rezumat**
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de obținere a maielei bacteriene uscate pentru fabricarea produselor lactate fermentate.

„Instrucțiunea Tehnologică IT MD 67-0041795-079:2016 pentru fabricarea culturilor bacteriene concentrate liofilizate pentru produse lactate fermentate conform SM 308:212”

ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
MINISTERUL AGRICULTURII ȘI INDUSTRIEI ALIMENTARE
INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO – PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI
TEHNOLOGII ALIMENTARE

APROB

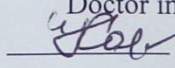
Directorul General al ISP de
Horticultură și
Tehnologii Alimentare
C. Dadu
” ” 2016

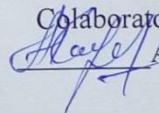


INSTRUCȚIUNE TEHNOLOGICĂ
IT MD 67-0041795-079:2016
pentru fabricarea culturilor bacteriene concentrate liofilizate pentru produse
lactate fermentate
conform SM 308:2012

ELABORAT:

ISPHTA
Laboratorul de biotehnologii
alimentare

Doctor în biologie
 Gh. Coev

Colaborator științific
 A. Cartășev

Chișinău 2016

Adeverință de depozitare și pașaportul al tulpinii *Lactobacillus bulgaricus* CNMN-LB-42

 INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL A.Ș.M. COLECȚIA NAȚIONALĂ DE MICROORGANISME NEPATOGENE str. Academiei, 1, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova, Tel. (373 22) 73 96 09, e-mail: imbenmn@yahoo.com	
ADEVERINȚĂ DE DEPOZITARE	
<u>Bureț E., Galicinscaia Z., Coev G.</u> (numele, prenumele)	
<u>Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare</u> (denumirea organizației)	
<u>str. Vierul 59, MD-2070, or. Codru, mun. Chișinău, Republica Moldova</u> (adresa deponentului)	
<u><i>Lactobacillus bulgaricus</i> B-2i(99) -</u>	
destinată utilizării în compoziția culturilor starter pentru fabricarea iaurtului. (Genul, specia și destinația tulpinii)	
Numărul de înregistrare, invocat tulpinii depozitate de către Colecție: <u><i>Lactobacillus bulgaricus</i> CNMN-LB-42</u>	
Data depozitării: 15.11.2012	
<u>Adresa și denumirea colecției:</u> str. Academiei 1, MD-2028, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene (CNMN), Chișinău, Republica Moldova Tel.: (+373 22) 73 96 09 E-mail: imbenmn@yahoo.com Web: www.imb.asm.md	
Directorul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie, academician, profesor universitar Șef al CNMN, doctor în biologie	 <u>V. Rudic</u> <u>O. Chiselita</u>

Act de implementare a tehnologiei de fabricare a produsului de brânză semitare cu grăsimi vegetale eliberat de SA SUCCES (Râșcani, R. Moldova) la 27.04.2006

SUCCES S.A.

str. Alba Iulia, 81, MD-4301 Causeni, Raionul Causeni, Tel/fax +373243/26603



ACT DE IMPLEMENATRE Nr. 1

din 27 aprilie 2016

(contractul nr. 08/15-02/2016 din 4 ianuarie 2016)

Denumirea propunerii pentru implementare:

ELABORAREA TEHNOLOGIEI DE FABRICARE A PRODUSULUI DE BRÎNZĂ SEMITARE CU GRĂSIMI VEGETALE, CONFORM STANDARDULUI DE FIRMA SF 15861966-001:2016 ȘI INSTRUCȚIUNII TEHNOLOGICE IT MD 67-15861966-001:2016

Autorii: Coev Gh., Cartășev A.

Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare

Instituția unde s-a implementat și perioada de implementare:

SA "SUCCES" perioada 04.01.2016 – 01.04.2016

Investigațiile implementate:

I. Organizarea fluxului tehnologic: recepție laptelui și înlocuitorilor de grăsime lactică; separarea laptelui, pasteurizare, maturarea laptelui degresat; pregătirea unei emulsii de grăsimi vegetale și compunerea amestecului; pasteurizare, prepararea amestecului pentru coagulare; coagulare amestecului, prelucrarea coagulului și a bobului de coagul; formare și presare a coagulului; sărarea produsului de brânză; ambalare sub vid; maturare a produsului de brânză; etichetare a produsului de brânză; depozitarea și păstrarea produsului de brânză.

II. Încercarea fluxului tehnologic cu monitorizarea și verificarea punctelor critice a procesului de fabricare;

III. Producerea loturilor experimentale de produs de brânză cu grăsimi vegetale în asortiment:

- produs de brânză semitare cu grăsimi vegetale, cu fracția masică de grăsime totală în substanță uscată 45%;
- produs de brânză semitare cu grăsimi vegetale, cu fracția masică de grăsime totală în substanță uscată 50%;
- produs de brânză semitare cu grăsimi, cu fracția masică de grăsime totală în substanță uscată 55%.

IV. Investigații organoleptice, fizico-chimice și microbiologice ale produselor obținute.

În total au fost fabricate 3 loturi de produse câte 10 kg, ambalate sub vid în ambalaje din polietilenă multistrat, cu masa neto 500 g.

Obiectul lucrărilor de implementare:

Fabricarea produsului de brânză cu grăsimi vegetale (în asortiment), obținute prin coagulare cu preparate de coagulare și bacterii lactice, destinate nemijlocit pentru consumul alimentar.

Materia primă și ingrediente funcționale utilizate la fabricare: lapte degresat, înlocuitor de grăsime lactică: amestec nehidrogenizat de grăsimi vegetale fără transizomere al acizilor grași; culturi starter; enzimă coagulantă; sare de uz alimentar; clorură de calciu E 509; nitrat de potasiu E 252; colorant natural Annatto E 160b.

Proces verbal de producere a culturilor starter, eliberat de DTA a IP IȘPHTA la 20.06.2015

ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
MINISTERUL AGRICULTURII ȘI INDUSTRIEI ALIMENTARE
INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO - PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII
ALIMENTARE



APROB
Director general al IȘP de Horticultură și
Tehnologii Alimentare
dr. hab. DADU C.

PROCES VERBAL DE PRODUCERE

Nr. 4 din 15 iunie 2015

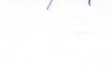
Chișinău, IP IȘPHTA

Noi, subsennații: șef de laborator Ghenadie COEV, cercetători științifici Elena BUREȚ, Anatoli CARTAȘEV, am întocmit acest proces verbal, confirmând, că în Laboratorul de biotehnologii alimentare în perioada de 8– 12 iunie 2015, în baza tulpinilor autothone din Colecția Ramurală au fost fabricate 3 loturi de culturi starter pentru iaurt:

1. YO1 – *S. thermophilus* CNMN-LB-50, CNMN-LB-51 și *Lb. bulgaricus* CNMN-LB-42;
2. YO2 – *S. thermophilus* CNMN-LB-50, CNMN-LB-52 și *Lb. bulgaricus* CNMN-LB-42;
3. YO3 – *S. thermophilus* CNMN-LB-52, CNMN-LB-53, CNMN-LB-54 și *Lb. bulgaricus* CNMN-LB-42;

Caracteristicile culturilor starter sunt în conformitate cu SM 307:2012 Culturi bacteriene concentrate liofilizate pentru produse lactate fermentate. Condiții tehnice.

Mostrele fabricate au fost puse la păstrare (-18 °C) în Laboratorului de biotehnologii alimentare.

 Coev G.
 Cartășev A.
 Bureț E.

Act de implementare a culturilor starter în cadrul concernului SA JLC-Group (Chișinău, R. Moldova) din 15.09.2015

**CERTIFICAT DE TESTARE la scară semiindustrială
a culturilor starter pentru iaurt**

Noi, subsemnații:

Președinte al comisiei:

Obuhova Olga – Tehnolog-Șef al concernului “JLC Group”

Membrii comisiei:

Ștefîrța Irina - Maistru de producere

Coev Ghenadie - Șef de laborator de biotehnologii alimentare, ISPHTA

Lazareva Valentina - Inginer chimic, Laboratorul de biotehnologii alimentare, ISPHTA

Bogdan Nina – Microbiolog, Laboratorul de biotehnologii alimentare, ISPHTA

Cartășev Anatoli – cercetător științific, doctorand IMB AȘM

Confirmăm prin prezenta, că în perioada 9-11 septembrie 2015 am efectuat încercări de testare a culturilor starter pentru iaurt, elaborate în cadrul tezei de doctor în Laboratorul de Biotehnologii alimentare al ISPHTA.

Culturile starter au fost formate din tulpini autohtone din specia *Streptococcus thermophilus* CNMN LB-50, LB-51, LB-51, LB-53, LB-54.

Încercările au fost realizate în secția de producere a smântânii la SA “JLC”, Chișinău în conformitate cu instrucțiunile tehnologice și condițiilor tehnice pentru fabricarea iaurtului.

Confirmăm că culturile starter încercate în producere a loturilor experimentale de iaurt corespund cerințelor stipulate în *SM 307:2012 Culturi bacteriene concentrate liofilizate pentru produse lactate fermentate. Condiții tehnice*. Culturile au asigurat fermentarea laptelui în timp de 3 – 4 ore, numărul de bacterii lactice viabile a fost de $10^8 - 10^9$ UFC în 1 cm³ produs finit.

Confirmăm că caracteristicile organoleptice, fizico-chimice și microbiologice ale iaurtului corespund cerințelor indicate în *Reglementarea Tehnică “Lapte și produse lactate”*.

Concluzii:

1. Culturi starter pentru iaurt prezintă interes practic și economic și pot fi implementate în producere produselor lactate fermentate cu investiții minime la întreprindere.

2. Pentru moment implementarea culturilor starter autohtone este imposibilă din cauza absenței producerii concentratelor bacteriene în volum necesar pentru întreprinderile de prelucrare a laptelui.

Recomandare:

Se recomandă organizarea producerii de culturi starter formate din tulpini autohtone de bacterii lactice.

Președinte al comisiei:

Membrii comisiei:



Obuhova Olga

Ștefîrța Irina
Coev Ghenadie
Lazareva Valentina
Bogdan Nina
Cartășev Anatoli

Extras din Proces verbal de degustare a sortimentului de iaurt cu conținut de culturi starter din tulpini autohtone de *S. thermophilus*.



APROB:
Director general al ISPHTA
dr. hb. C.Dadu

EXRTAS
din proces-verbal nr. 8
al ședinței comisiei de degustare
din 14 septembrie 2015

Au participat:

Reprezentanții Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare:

Dr. Gh. Coev – șef laboratorului de biotehnologii alimentare, președintele comisiei;

E. Bureț – cercetător științific;

L. Necrîlova – cercetător științific;

A. Cartășev – cercetător științific;

N. Bogdan – cercetător științific;

I. Grumeza – cercetător științific;

I. Fedotchina – laborant superior;

M. Barbaroș – cercetător științific;

V. Lazareva – secretar comisiei de degustare.

Reprezentatnt concernului “JLC Group”:

I.Ștefirța – maestru secție de producere SA JLC

Prezentarea lucrării:

1. Deschiderea ședinței de degustare a fost susținută de șeful laboratorului de biotehnologii alimenmtare dr. În biologie Coev Gh.
2. Cuvînt pentru prezentare a lucrărilor efectuate i s-a oferit doctorandului Cartășev A. care a prezentat sortimentul de produse supuse degustării.

Scopul degustării:

Aprecierea sortimentului de iaurt, fabricat cu utilizarea culturilor starter elaborate în cadrul tezei de doctor “Tulpini autohtone noi de *Streptococcus thermophilus* și utilizarea lor pentru fabricarea produselor lactate fermentate”.

Obiectul degustării:

1. Iaurt 2,5% fabricat cu cultură starter YO1 (EPZ);
2. Iaurt 0,1% fabricat cu cultură starter YO1 (EPZ);
3. Iaurt 2,5% fabricat cu cultură starter YO2 (EPZ);
4. Iaurt 0,1% fabricat cu cultură starter YO2 (EPZ);
5. Iaurt 2,5% fabricat cu cultură starter YO3 (fără EPZ);
6. Iaurt 0,1% fabricat cu cultură starter YO3 (fără EPZ);

Rezultatele degustării:

Rezultatele degustării deserturilor sunt prezentate în tabelul 1.

Aprecierea organoleptică generală a mostrelor de deserturi:

Tabelul 1

№ d/o	Denumirea mostrei	Nota medie
1.	Iaurt 2,5% fabricat cu cultură starter YO1 (EPZ);	4.9
2.	Iaurt 0,1% fabricat cu cultură starter YO1 (EPZ);	4.86
3.	Iaurt 2,5% fabricat cu cultură starter YO2 (EPZ);	4.92
4.	Iaurt 0,1% fabricat cu cultură starter YO2 (EPZ);	4.76
5.	Iaurt 2,5% fabricat cu cultură starter YO3 (fără EPZ);	4.75
6.	Iaurt 0,1% fabricat cu cultură starter YO3 (fără EPZ);	4.12

Dezbateri:

D-ul dr. Coev Gh. a menționat că: au plăcut mai mult mostrele de iaurt 2,5% de grasime cu și fără tulpini producătoare de exopolizaharide, se simte, că sînt naturale, cu consistență viscoasă și densă. Mostrele de iaurt degresat au avut gust mai acru în comparație cu cei 2,5%, aspect fluid și potrivit pentru alimentație. Toate mostrele au avut proprietăți organoleptice plăcute. .

Mostra 1 și 3: sunt mai bune decît mostra 5.

Mostra 6: nu are are consistența iaurtului.

Mostra 2: este cea mai plăcută dintre cele degresate.

D-a I. Ștefîrța a menționat că:

Mostra 1: este foarte plăcută, se simte gustul iaurtului natural, gust acrișor, foarte placut. După consistența în gură are caracter vâscos și totodată consistența densă. După aspectul vizual este lucios

Mostra 2 și 4: sunt la fel de plăcute. Consistența fluidă vâscosă și acid lactic este mai pronunțat, pentru iaurt de băut sunt variante foarte bune.

Mostra 6: după gust este o variantă bună, coagul este separat pe bucăți.

În concluzie vreau sa menționez că toate mostrele sunt reușite și vă recomand de a utiliza culturile starter și pentru iaurt de 1% de grăsime.

D-na L. Necrîlova a menționat că toate mostrele au fost bune și comparativ cu cele din supermarketuri sunt naturale autohtone și sănătoase. Cea mai buna după gustul meu era mostra 3.

D-na E. Bureș a menționat că:

Mostra 3: este foarte plăcută, dar gustul prea acru.

Mostra 6: au consistența foarte distrusă.

Cea mai reușită mostra este nr. 1

D-ra N. Bogdan a menționat că: toate mostrele sunt plăcute.

Mostra 1: merită nota „5”.

Mostra 6: nu le-a plăcut consistența produsului.

Mostra 5: consideră, că prezintă o varianta reușită cu toate că era fabricată fără utilizarea culturilor de producătoare de exopolizaharide

D-ra I. Grumeza consideră că mostrele de iaurt degresat ar fi bine de majorat în grăsimi rețetă de producere, cu toate că mostrele prezentate la degustație sunt competitive cu cele prezente pe piața. Culturile starter utilizate au valoarea aplicativă incontestabilă.

D-na M. Barbaroș a menționat că toate mostrele sunt plăcute. Totuși, variante cu exopolizaharide sunt mai bogate în gust și consistența este mai stabilă. La variantele fără exopolizaharide se vede că s-a eliminat zerul , dar este la nivel standard și mai puțin. Cele mai bune variante sunt mostre 1, 3, 4 și 5. Este evident că mostra 6 nu este iaurt nici într-un fel.

Concluzii:

Toate mostrele de deserturi propuse spre degustare sunt admisibile și au fost apreciate cu note înalte, doar că e necesar de corectat următoarele:

- se va îmbunătăți mostra 8: această mostră de desert lactat trebuie să fie prelucrată din punct de vedere a micșorării procentului de umplutură sau cu ajutorul combinării lui cu cacao-praf.

Secretar



V. Lazareva

**Institutul Științifico-Practic de
Horticultură și Tehnologii Alimentare
Proces-verbal Nr. 8**

*al ședinței comisiei de degustare „Aprecierea organoleptică a mostrelor de deserturi lactate pe
bază de smântină și frască”
din „ 14 ” septembrie 2009*

Tabelul 2

№ d/o	DENUMIREA MOSTREI	Numele, prenumele degustatorului									Tabelul 2		
		<i>Coev Gh</i>	<i>Ștefirta I.</i>	<i>Bureș E.</i>	<i>Necrîlova L.</i>	<i>Bogdan N.</i>	<i>Fedotchina I.</i>	<i>Grumeza I.</i>	<i>Barbaros M.</i>	<i>Lazareva V.</i>	<i>Numărul de note</i>	<i>Suma balurilor</i>	<i>Notă medie</i>
2.	Iaurt 2,5% fabricat cu cultură starter YO1 (LB-50 EPZ);	4,96	4,92	4,86	4,92	4,84	4,96	4,92	4,86	4,86	9	44,1	4,9
3.	Iaurt 0,1% fabricat cu cultură starter YO2 (EPZ);	4,84	4,82	4,78	4,8	4,84	4,84	4,82	4,82	4,84	9	43,4	4,76
4.	Iaurt 0,1% fabricat cu cultură starter YO1 (EPZ);	4,86	4,94	4,84	4,82	4,86	4,86	4,84	4,86	4,9	9	43,8	4,86

Tabelul 2 (continuare)

№ d/o	DENUMIREA MOSTREI	Numele, prenumele degustatorului									Numărul de note	Suma balurilor	Notă medie
		<i>Coev Gh</i>	<i>Ștefăra I.</i>	<i>Bureș E.</i>	<i>Necrîlova L.</i>	<i>Bogdan N.</i>	<i>Fedotchina I.</i>	<i>Grumeza I.</i>	<i>Barbaros M.</i>	<i>Lazareva V.</i>			
6.	Iaurt 2,5% fabricat cu cultură starter YO2 (LB-51 EPZ);	4,96	4,92	4,88	4,96	4,88	4,94	4,94	4,88	4,92	9	44,3	4,92
7.	Iaurt 2,5% fabricat cu cultură starter YO3 (fără EPZ);	4,78	4,7	4,78	4,74	4,72	4,74	4,8	4,76	4,78	9	42,8	4,75
8.	Iaurt 0,1% fabricat cu cultură starter YO3 (fără EPZ);	4,28	4,2	4	4	3,98	4,18	4,1	4,16	4,14	9	37,0	4,12

Secretar



V. Lazareva

Brevet de invenție de scurtă durată MD 865 „Procedeu de obținere a produsului lactate fermentat.


REPUBLICA MOLDOVA
Agencia de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ
Nr. 865

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: Procedeu de obținere a produsului lactat fermentat praf

Titular: INSTITUȚIA PUBLICĂ INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII ALIMENTARE, MD

Data depozit: 2014.06.30

Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

Director General


CHIȘINĂU

Diplome la Saloanele internaționale de invenții









Medalia de aur
se acordă

Dlui/Dnei: Anatoli Cartășev, Elena Bureț, Ghenadie Coev
Instituția Publică „Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare, Republica Moldova

Pentru: Procedeu de obținere a produselor lactate fermentate praf

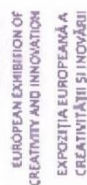
UGAL INVENT
SALONUL INOVĂRII și CERCETĂRII
19-20 Octombrie 2017
Galați - România

Rector,
Prof. dr. ing. Iulian Gabriel Bîrsan

Președinte Salon UGAL INVENT 2017,
Prof. dr. ing. Cătălin Fetecău



Eveniment organizat sub patronajul
Ministerului Cercetării și Inovării



IAȘI - ROMÂNIA



DIPLOMA
OF
BRONZE MEDAL

Method for producing powdered fermented milk products

Cartașev Anatoli, Bureț Elena, Coev Ghenadie

President of International Jury
Dr.Eng. Mohd Mustafa ATBakri ABDULLAH

President of Exhibition
Prof. Ion SANDU



EUROINVENT 2017





Darea de seamă referitor la determinarea termenului de valabilitate pentru sortimentul de iaurt fabricat cu culturi starter autohtone pe bază de tulpini din specia *S. thermophilus*

ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
MINISTERUL AGRICULTURII ȘI INDUSTRIEI ALIMENTARE
INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO – PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI
TEHNOLOGII ALIMENTARE



APROB:

Director general al ISPHTA
dr. hb. C.Dadu

DAREA DE SEAMĂ

referitor la efectuarea cercetărilor privind determinarea termenului de valabilitate pentru sortiment de iaurt fabricat cu culturi starter autohtone pe bază de tulpini din specia *Streptococcus thermophilus*

Executorul responsabil:
Șef al laboratorului de
biotehnologii alimentare,
doctor în biologie

Gh.Coev

Executorii:

Colaborator științific

A. Cartășev

Colaborator științific

N.Bogdan

Inginer-chimist

V.Lazareva

Chișinău 2015

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnatul, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Cartașev Anatoli

Semnătura



Data 12.06.2018

CV al autorului

Nume, prenume:

Cartașev Anatoli

Data și locul nașterii:

04 iulie 1984, Chișinău, R. Moldova

Studii:

2011-2014 Institutul de Microbiologie al AȘM, doctorand specialitatea „Biotehnologie”.

2009-2011 Universitatea Tehnică a Moldovei, masterand
Diploma de master în Tehnologii de fabricare și prelucrare

2003-2008 Universitatea Tehnică a Moldovei, student, inginer licențiat în Tehnologia laptelui și a produselor lactate

Activitatea profesională:

2009 - Prezent IP Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare, Laboratorul de biotehnologii alimentare, Chișinău (Republica Moldova), cercetător științific

2008-2009 DINA-COCIUG SRL, designer industrial

Domeniile de activitate științifică:

Biotehnologie. Tehnologia produselor alimentare: dezvoltarea și elaborarea tehnologiilor de procesare a materiei prime agroalimentare de origine vegetală și animală; asigurarea calității și siguranței alimentelor.

Lucrări științifice publicate: 21, dintre care 9 articole (1- revistă internațională cotate ISI și SCOPUS, 3- reviste recunoscute în străinătate, 1- revistă din Registrul Național al revistelor de profil, categoria B, 4- culegeri; 3- în monoautorat), 10 rezumate ale comunicărilor științifice; 1 brevet de invenție de scurtă durată și 1 cerere de brevet de invenție de scurtă durată.

Participări la foruri științifice internaționale:

- The 10th Edition of EUROINVENT European Exhibition of Creativity and Innovation (Iași, România, 2018)
- The 9th Edition of EUROINVENT European Exhibition of Creativity and Innovation (Iași, România, 2017);
- UGAL INVENT Salonul Inovării și cercetării (Galați, România, 2017);
- The III-d International Conference of Modern Technologies in the Food Industry (Chișinău, Republica Moldova, 2016);
- The 3rd International Conference On Microbial Biotechnology (Chișinău, Republica Moldova, 2016);
- Международная Конференция Молодых Ученых Биотехнологов, Молекулярных Биотехнологов и Вирусологов, Новосибирск, Россия, 2017, 2016);



- The XIV-th International Specialized Exhibition “INFOINVENT” (Chișinău, Republica Moldova, 2015);
- Sibiu Alma Mater University Conference „Challenges for Science and Research in the Crisis Era” (Sibiu, România, 2013);
- Simpozionul Științific Internațional „Agricultura Modernă – Realizări și Perspective” consacrat aniversării de 80 de ani de la înființarea Universității Agrare de Stat din Moldova (Chișinău, Moldova, 2013);
- International Conference „Modern Technologies in the Food Industry” (Chișinău, Moldova, 2012);
- Conferința Tehnico-Științifică a Colaboratorilor, Doctoranzilor și Studenților (Chișinău, Moldova, 2012);
- International Conference of Young Researchers, 9ed. (Chișinău, Moldova, 2011).

Participări la proiecte științifice naționale și internaționale:

06-407-004A (2006-2010) „Tehnologii avansate de prelucrare a materiei prime agricole și a produselor de zootehnie”. executant

11.817.04.32A (2011-2014) „Tehnologii inovatoare de prelucrare a materiei prime agricole, de origine vegetală și animalieră”. executant

15.817.05.03A (2015-2018) „Dezvoltarea tehnologiilor de procesare a materiei prime agroalimentare indigene în asigurarea calității și siguranței alimentelor”. executant

16.80012.51.23A (2017-2018) „Produs inovativ din lapte de capră cu proprietăți biologice sporite”. executant responsabil

Premii și mențiuni:

1. Bursa de excelență a Guvernului Republicii Moldova (2013).
2. Bursa de excelență a Federației Mondiale a Științelor (FMS) (2014).
3. The 10th Edition of EUROINVENT European Exhibition of Creativity and Innovation (Iași, România, 2018) – Medalie de aur.
4. UGAL INVENT Salonul Inovării și cercetării (Galați, România, 2017) – Medalie de aur.
5. The 9th Edition of EUROINVENT European Exhibition of Creativity and Innovation (Iași, România, 2017) – Medalie de bronz.
6. The XIV-th International Specialized Exhibition “INFOINVENT” (Chișinău, Republica Moldova, 2015) – Medalie de bronz.

Date de contact:

Cartășev Anatoli, cercetător științific,
Laboratorul Biotehnologiei alimentare
IP Institutul științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare
MD 2011, Chișinău, Codru, str. Vierului 59,
Tel.: +373 69782909,
e-mail: anatoli.cartasev@imb.asm.md