

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII
INSTITUȚIA PUBLICĂ INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI
BIOTEHNOLOGIE**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 579.2/.6/.8:60:637.146

BOGDAN NINA

**VALORIFICAREA TULPINILOR MICROBIENE IZOLATE DIN
LAPTE DE CAPRĂ PENTRU APLICARE INDUSTRIALĂ**

167.01 - BIOTEHNOLOGIE, BIONANOTEHNOLOGIE

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

CHIȘINĂU, 2019

- Teza a fost elaborată în cadrul Direcției „Tehnologii Alimentare” a Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare și în condițiile de producere la întreprinderea SRL „Major-Auto” or. Taraclia, Republica Moldova.

Conducător științific:

Rudic Valeriu dr. hab. șt. biol., prof. univ., acad., Om Emerit al Republicii Moldova

Referenți oficiali:

USATÎ Agafia, dr. hab. șt. biol., prof. cercet., Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

CHIRSANOVA Aurica, dr. șt. biol., conf. univ., Universitatea Tehnică a Moldovei

Componența Consiliului Științific Specializat aprobată prin Decizia Consiliului de Conducere al Agenției Naționale de Asigurare a Calității în Educație și Cercetare nr.1 din 27 septembrie 2019:

Președintele Consiliului Științific Specializat:

STURZA Rodica, dr. hab. șt. tehnice, prof. univ., Universitatea Tehnică a Moldovei

Secretarul Consiliului Științific Specializat:

RUDI Ludmila, dr. șt. biol., conf. cercet., Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

Membrii Consiliului Științific Specializat:

BURȚEVA Svetlana, dr. hab. șt. biol., prof. cercet., Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

CHISELIȚA Oleg, dr. șt. biol., conf. cercet., Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

RUBȚOV Silvia, dr. șt. tehnice, conf. univ., Universitatea Tehnică a Moldovei

Susținerea va avea loc la **05 decembrie 2019, ora 14.00**

în ședința Consiliului Științific Specializat **D 167.01-117** din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie, MD-2028, mun. Chișinău, str. Academiei 1, biroul 352.

Teza de doctor în baza căreia se susține teza și rezumatul pot fi consultate la Biblioteca Științifică Centrală a Academiei de Științe a Moldovei „A. Lupan” și pe pagina web a ANACEC (www.anacip.md).

Rezumatul a fost expedit la „ _____ ” noiembrie 2019

Secretar științific al Consiliului Științific Specializat,

RUDI Ludmila, dr. șt. biol., conf. cercet.


Conducător științific,

RUDIC Valeriu, dr. hab. șt. biol., prof. univ., acad.,

Om Emerit al Republicii Moldova

Autor

Bogdan Nina



© Bogdan Nina, 2019

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII	4
1. LAPTELE DE CAPRĂ SI BACTERIILE LACTICE UTILIZATE LA FABRICAREA BRÂNZETURILOR.....	7
2. OBIECTELE DE STUDIU ȘI METODELE APLICATE ÎN CERCETARE.....	7
3. SELECTAREA TULPINILOR AUTOHTONE DE BACTERII LACTICE DIN LAPTE DE CAPRĂ.....	8
3.1 Caracteristicile culturale și morfologice ale tulpinilor autohtone de bacterii lactice	8
3.2 Caracteristicile fiziologice și biochimice ale tulpinilor autohtone de bacterii lactice	9
3.3 Proprietățile tehnologice ale tulpinilor autohtone de bacterii lactice	10
3.4 Determinarea parametrilor biotehnologici optimi pentru culturile de bacterii lactice	12
3.5 Mediul nutritiv și de protecție pentru bacterii lactice izolate din laptele de capră.....	14
4. ELABORAREA TEHNOLOGIEI DE FABRICARE A BRÂNZEI CU APLICAREA CULTURII STARTER AUTOHTONE DE BACTERII LACTICE.....	16
4.1 Asocierea tulpinilor de bacterii lactice autohtone în cultura starter pentru fabricarea brânzei .	16
4.2 Implementarea culturii starter elaborate la fabricarea brânzei	18
4.3 Determinarea indicilor de calitate și a termenului de valabilitate ale brânzei din lapte de capră	19
4.4 Fezabilitatea economică a fabricării brânzei din lapte de capră cu utilizarea culturii starter autohtone	20
CONCLUZII GENERALE.....	21
LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI	23
ADNOTARE	27

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța temei abordate. Laptele de capră, datorită proprietăților dietetico-curative pronunțate, prezintă un produs cu calități nutritive excelente, valoare biologică sporită și joacă un rol important în alimentația populației. Posedă proprietăți antioxidante înalte, o compoziție omogenă și ușor asimilabilă a proteinelor, cu conținut înalt de aminoacizi, și practic nu produce reacții alergice și tulburări digestive. În comparație cu laptele de vacă, are un conținut mai bogat în vitamine, acizii caprinic și linoleic, micro- și macroelemente ușor asimilabile, și conține cu mult mai puțin colesterol [1].

În Republica Moldova se observă o tendință de majorare a șeptelului de capre și sporire a volumului de lapte obținut [2]. Prin urmare, producția caprinelor reprezintă un important potențial alimentar, iar valorificarea lui la nivel industrial cu obținerea produselor lactate fermentate este relevantă și avantajoasă.

Obținerea produselor lactate fermentate se bazează pe utilizarea culturilor de bacterii lactice, proprietățile cărora determină calitatea produsului finit. Produsele lactate obținute prin utilizarea culturilor de bacterii lactice contribuie la ameliorarea metabolismului, iar proprietățile lor antimicrobiene pronunțate duc la stoparea proceselor de putrefacție și de formare a produselor toxice în urma procesului de descompunere a proteinelor.

Laptele crud de capră prezintă o sursă naturală de obținere a tulpinilor active de bacterii lactice cu proprietăți biotehnologice importante pentru industria alimentară, depășind laptele de vacă după raportul componentelor, valoarea biologică, indicii fizico-chimici și microbiologici (laptele de capră conține cu mult mai puține bacterii patogene decât laptele altor animale).

Obținerea produselor lactate din lapte de capră cu utilizarea culturilor pure de bacterii lactice special selectate, de asemenea obținerea culturilor starter destinate fabricării produselor lactate fermentate din lapte de capră asigură diversificarea materiei prime și a sortimentului produselor alimentare și dietetice cu valoare nutritivă înaltă [3].

Mulți specialiști din industria laptelui recunosc necesitatea și importanța utilizării tulpinilor autohtone de bacterii lactice, de aceea în ultimul timp au devenit tot mai actuale cercetările de izolare a și valorificare a tulpinilor autohtone de bacterii lactice cu proprietăți probiotice, competitive și relevante pentru industria alimentară, în perspectiva utilizării lor industriale în producția de alimente funcționale [4]. De aceea, apare necesitatea de a cerceta microflora spontană a laptelui crud de capră, de a izola culturi pure de bacterii lactice, de a studia și selecta tulpinile cu proprietăți biotehnologice importante și a le valorifica prin crearea unor noi game de culturi starter destinate fabricării produselor din lapte de capră.

Studierea diversității bacteriilor lactice izolate din lapte crud de capră de perspectivă, identificarea și caracterizarea lor este un subiect mereu actual în biotehnologie și în special în industria laptelui.

Tulpinile microbiene izolate din habitatul lor natural - laptele de capră, prezintă o varietate largă de tulpini de bacterii lactice active cu proprietăți tehnologice importante, de aceea prezintă interes atât din punct de vedere fundamental cât și aplicativ. Importanța industrială a bacteriilor lactice izolate din lapte crud poate fi demonstrată prin studierea diversității speciilor izolate și a posibilității utilizării lor în industria laptelui [5].

Un interes deosebit față de acest obiect de studiu se observă în cercetările efectuate în țările din regiunile aride, prin izolarea tulpinilor speciilor *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactococcus lactis ssp. lactis* cu proprietăți tehnologice valoroase, cum sunt activitatea proteolitică, acidogeneza și activitatea antimicrobiană sporită, producerea bacteriocinelor, rezistența la bacteriofagi, capacitatea sporită de adaptare la condițiile climaterice locale și materia primă autohtonă. Prin urmare, este foarte importantă aplicarea acestor culturi active și stabile cu proprietăți bine determinate, în compoziția culturilor starter destinate fabricării produselor lactate fermentate din lapte de capră.

Interesul crescând față de culturile starter se datorează în mare măsură dezvoltării industriei laptelui, atât pe plan mondial, cât și local. Conform datelor statistice, în Republica Moldova, în pofida dinamicii pozitive a efectivului caprinelor, cantitatea produselor în baza laptelui de capră scade din cauză lipsei unui program organizat de creștere și valorificare a acestui potențial. Elaborarea și fabricarea produselor lactate fermentate din lapte de capră, de calitate și siguranța garantată, este direct legată de baza tehnico-normativă și îmbogățirea colecțiilor de microorganisme cu noi tulpini de bacterii lactice de interes biotehnologic [2,6].

Scopul cercetării expuse în prezenta lucrare a constat în selectarea tulpinilor de bacterii lactice cu potențial biotehnologic valoros pentru industria laptelui și utilizarea lor în compoziția culturilor starter destinate fabricării produselor lactate din lapte de capră.

Obiectivele cercetărilor au fost următoarele:

1. Izolarea culturilor pure de bacterii lactice din laptele crud de capră;
2. Identificarea tulpinilor izolate conform studiului caracteristicilor morfologice, culturale, fiziologice și biochimice;

3. Studiul proprietăților biotehnologice și selectarea tulpinilor de bacterii lactice tehnologice valoroase pentru industria laptelui;
4. Aplicarea tulpinilor selectate în compoziția culturilor starter destinate fabricării brânzei din lapte de capră;
5. Elaborarea tehnologiei de obținere a brânzei din lapte de capră.

Ipotezele cercetării:

1. Eficiența tehnologiilor de fabricare a produselor lactate poate fi sporită prin utilizarea culturilor starter autohtone stabile, cu proprietăți tehnologice selecționate, adaptate la calitatea materiei prime și condițiile specifice de producere.
2. Prin valorificarea laptelui de capră în calitate de sursă de culturi bacteriene noi cu proprietăți tehnologice valoroase pot fi elaborate culturi starter ieftine și eficiente, utilizarea cărora în procesul de fabricare a produselor lactate, va asigura un efect dublu – tehnologic și igienic.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese. În conformitate cu scopul și obiectivele trasate, în vederea demonstrării ipotezelor de cercetare înaintate, au fost aplicate metode clasice și moderne de studiu, inclusiv:

- metode microbiologice clasice de izolare și selectare a bacteriilor lactice din lapte crud de capră și identificare a lor în baza caracterelor morfo-culturale și fiziologo-biochimice;
- metode fizico-chimice, biochimice și microbiologice moderne de apreciere a calității materiei prime și evaluare a culturilor starter obținute, în condiții de laborator și industriale;
- metode de păstrare a culturilor starter;
- metode standardizate conform regulamentelor normative în vigoare de obținere și evaluare a calității produselor obținute;
- metode matematice de planificare a experiențelor;
- metode statistice de analiză a rezultatelor și evaluare a rentabilității tehnologiei elaborate etc.

CONȚINUTUL TEZEI

În capitolul **INTRODUCERE** sunt evidențiate actualitatea și importanța temei abordate, noutatea științifică a lucrării, valoarea teoretică și aplicativă a rezultatelor obținute; sunt formulate obiectivele și problemele de cercetare.

1. LAPTELE DE CAPRĂ ȘI BACTERIILE LACTICE UTILIZATE LA FABRICAREA BRÂNZETURILOR

În acest capitol este prezentată o amplă analiză a realizărilor științifice în domeniul studiului laptelui de capră și valorificării practice a bacteriilor lactice, în special tulpinilor izolate din lapte de capră. Studiul bibliografic efectuat a inclus 179 lucrări științifice relevante din domeniul microbiologiei, biotehnologiei, biochimiei și tehnologiei, care reflectă avantajele laptelui de capră ca produs și sursă de izolare a tulpinilor microbiene valoroase pentru prelucrarea laptelui, importanța și scopul izolării, identificării, selectării, studierii și rolul lor în procesul de fabricare a produselor 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.

2. OBIECTELE DE STUDIU ȘI METODELE APLICATE ÎN CERCETARE

În calitate de obiecte de studiu au servit tulpini autohtone de bacterii lactice izolate din habitat natural - lapte crud de capră din diferite regiuni ale Republicii Moldova și tulpini de referință.

Studierea tulpinilor de bacterii lactice a fost realizată conform etapelor principale:

- Izolarea, identificarea și selectarea tulpinilor autohtone de bacterii lactice;
- Studiarea proprietăților morfo-culturale, fiziologo-biochimice și tehnologice ale tulpinilor selectate;
- Depozitarea bacteriilor selectate în CNMN;
- Utilizarea culturii starter pentru fabricarea brânzei din lapte de capră.

Metode de cercetare

În calitate de medii nutritive de bază pentru cultivarea bacteriilor lactice s-a utilizat lapte steril, degresat și hidrolizat conform GOST 33951-2016 „Lapte și produsele lactate. Metode de determinare a bacteriilor lactice”.

2.1 Metode microbiologice de cercetare, conform GOST 10444.12, SR EN ISO 6888-2, SM SR ISO 15214, SM EN ISO 4833-1, SM EN ISO 6579, SM ISO 4831, SM ISO 4832.

2.2 Metode biochimice de cercetare: Determinarea duratei de coagulare a laptelui; Evaluarea activității de acidulare [7]; Determinarea capacității de descompunere a esculinei; Determinarea capacității de fermentare a carbohidraților și alte teste biochimice [8, 9];

2.3 Metode fizico-chimice de cercetare: Determinarea acidității [7]; Determinarea conținutului de cloruri [10]; Determinarea conținutului total de substanță uscată [11];

Determinarea conținutului de grăsime prin metoda gravimetrică conform SM EN ISO 1735:2014 „Brânză și produse de brânză procesate. Determinarea conținutului de grăsime. Metoda gravimetrică”; Determinarea conținutului de lactoză prin metoda cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC) ISO 22662:2007.

Prelucrarea statistică a datelor privind rezultatele a 3-5 repetări s-a efectuat prin calcularea mediei, diviației standard și intervalului de încredere [12]. Prelucrarea matematică a datelor experimentale și întreprinderea grafică a rezultatelor a fost efectuată cu ajutorul programului *MO Excel*.

3. SELECTAREA TULPINILOR AUTOHTONE DE BACTERII LACTICE DIN LAPTE DE CAPRĂ

3.1 Caracteristicile culturale și morfologice ale tulpinilor autohtone de bacterii lactice

La prima etapă a fost realizată izolarea culturilor pure de bacterii lactice din 150 probe de lapte crud de capră prelevate din 12 regiuni ale Republicii Moldova: Briceni, Dondușeni, Soroca, Bălți, Florești, Ungheni, Orhei, Chișinău, Anenii Noi, Taraclia, Comrat, Cahul. Au fost studiate circa 300 izolate, din care au fost selectate 7, cu proprietăți stabile caracteristice subpeciilor *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris* și *Streptococcus thermophilus*. Aspectul coloniilor este ilustrat în Figura 3.1.

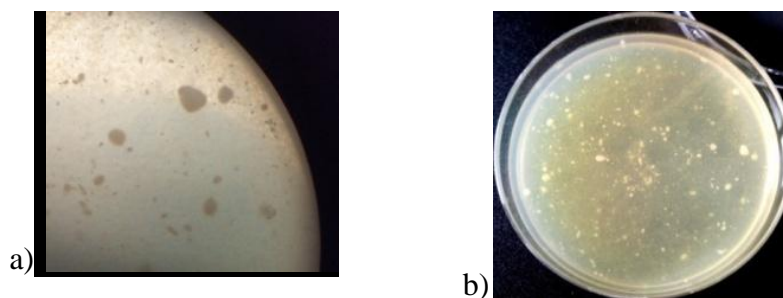


Fig. 3.1. Aspectul coloniilor de bacterii lactice: a)– colonie mărită de 6 ori, b) – aspect general al culturii pe mediul agarizat de lapte hidrolizat

La cultivare pe mediu agarizat de lapte hidrolizat tulpinile selectate au format colonii izolate sub formă de picătură, lucioase, cu margini netede (de tip S); lenticulare în profunzime, de culoare alb-crem; de dimensiuni mici cu diametrul până la 1 mm, cu consistență păstoasă.

Studierea proprietăților morfologice ale tulpinilor constă în aprecierea microscopică a preparatelor colorate după Gram cu puterea de mărire 100x (fig. 3.2.).

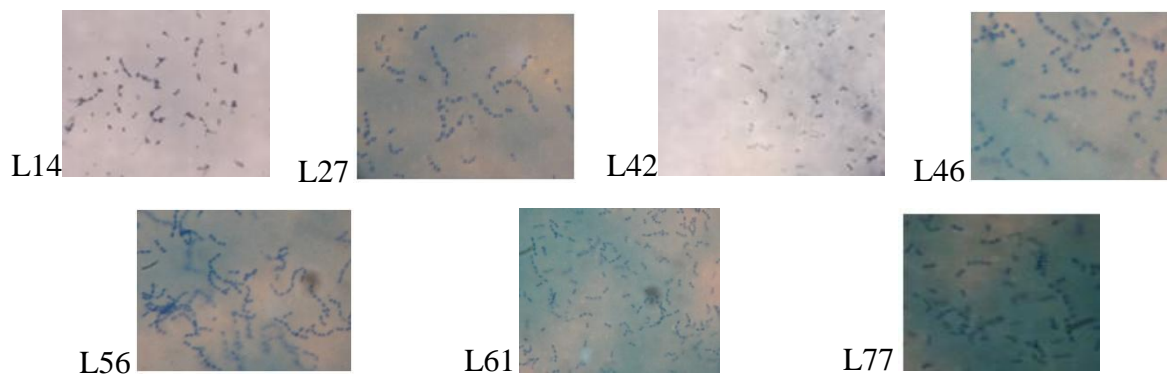


Fig. 3.2. Aspectul microscopic al tulpinilor

Microscopia a arătat, că toate tulpinile de bacterii lactice izolate din lapte de capră crud din diferite regiuni ale Republicii Moldova sunt Gram pozitive, prezintă coci și diplococi separați sau plasați în lanțuri de diferite lungimi, fapt caracteristic bacteriilor lactice mezofile și termofile.

3.2 Caracteristicile fiziologice și biochimice ale tulpinilor autohtone de bacterii lactice

În continuare au fost determinate proprietățile fiziologo-biochimice ale tulpinilor izolate care sunt prezentate în Tabelul 3.1.

Tabelul 3.1. Proprietățile fiziologo-biochimice ale tulpinilor de bacterii lactice izolate din lapte de capră

Caracteristici	Numărul tulpinii						
	L 14	L 27	L 42	L 46	L 56	L 61	L 77
Colorația Gram	+	+	+	+	+	+	+
Producerea CO ₂ din glucoză	-	-	-	-	-	-	-
Producerea catalazei	-	-	-	-	-	-	-
Producerea amoniacului din arginină	+	-	+	-	-	+	+
Rezistența la 60°C timp 30 min	+	+	+	+	+	+	+
Rezistența la NaCl, 2%	+	+	+	+	+	+	+
Rezistența la NaCl, 4%	+	-	+	-	+	+	+
Creșterea în albastru de metilen, 0,1%	+	+	+	+	-	+	+
Rezistența la bilă, 20%	+	+	+	+	-	+	+
Rezistența la bilă, 40%	+	+	+	+	-	+	+
Creșterea în mediul alcalin, pH 9,2	+	-	+	-	-	+	+
Creșterea în laptele turnesolat	-	-	-	-	+	-	-
Formarea diacetilului	-	-	-	-	-	+	-

Notă: + reacție pozitivă; - reacție negativă

Ținând cont de faptul, că fiecare tulpină asimilează un număr limitat și specific de surse de carbon, etapa crucială la identificarea bacteriilor lactice este determinarea capacității de fermentare a diferitor carbohidrați cu eliminarea acidului sau/și a CO₂ (tab. 3.2.). [8].

Tabelul 3.2. Fermentarea carbohidraților de către tulpinile de bacterii lactice izolate din lapte de capră

Numărul tulpinii	Carbohidrați												
	<i>Lactoză</i>	<i>Glucoză</i>	<i>Galactoză</i>	<i>Manitol</i>	<i>Zaharoză</i>	<i>Maltoză</i>	<i>Rafinoză</i>	<i>Amidon</i>	<i>Manoză</i>	<i>Sorbită</i>	<i>Glicerină</i>	<i>Arabinoză</i>	<i>Esculină</i>
L14	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L27	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
L42	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L46	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
L56	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L61	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L77	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Notă: + fermentează; - nu fermentează

Studiul proprietăților morfo-culturale și fiziologo-biochimice ale culturilor noi izolate din lapte crud de capră a permis de a stabili apartenența tulpinilor speciilor *Lactococcus lactis* (subspecii *L. lactis*, *L. cremoris*, *L. diacetylactis*) și *Streptococcus thermophilus* [13].

3.3. Proprietățile tehnologice ale tulpinilor autohtone de bacterii lactice

Un parametru tehnologic important de estimare a tulpinilor pentru utilizarea lor în compoziția culturii starter este durata procesului de cultivare, intensitatea dezvoltării bacteriilor lactice și acumularea acidului lactic în laptele fermentat, ceea ce influențează și determină calitatea și proprietățile funcționale ale produsului finit (aciditatea, consistența, gustul și mirosul coagulului). Pentru descrierea exactă a rezultatelor studiul s-a efectuat paralel în mediul nutritiv de lapte de vacă și mediul de lapte de capră. Tulpinile au fost cultivate la temperatură de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ (tab. 3.3.).

Tabelul 3.3. Viteza de fermentare a coagulului și acumularea acidului lactic

Codul tulpinii	Durata de coagulare, ore		Aciditatea titrabilă, °T	
	în lapte de vacă	în lapte de capră	în lapte de vacă	în lapte de capră
L14	6,1±0,2	5,2±0,1	85,3±0,9	78,1±0,6
L27	6,5±0,1	6,0±0,1	89,1±2,0	85,7±0,4
L42	6,5±0,3	5,3±0,2	79,1±0,3	74,2±1,8
L46	6,0±0,1	5,1±0,2	78,2±0,5	72,2±1,0
L56	4,6±0,2	4,4±0,3	75,0±0,6	70,6±1,2
L61	9,3±0,1	7,5±0,4	75,2±1,7	68,7±2,0
L77	6,5±0,2	5,5±0,1	98,1±1,5	93,3±0,7

Analiza datelor tabelului 3 demonstrează, că în mediul nutritiv de lapte de capră toate tulpinile se caracterizează prin viteză de acidulare mai înaltă - 4,4-7,7 ore, comparativ cu mediul de lapte de vacă - 4,6-9,3 ore. În același timp, creșterea intensivă a bacteriilor nu duce la

acumularea excesivă a acidului lactic, ce influențează favorabil parametrii fizico-chimici și organoleptici a produselor lactate. Rezultatele obținute demonstrează că activitatea fermentativă a tulpinilor și aciditatea titrabilă corespund cerințelor și nu depășesc limitele admisibile.

La etapa următoare, s-au efectuat analize microbiologice ale probelor de lapte fermentat cu tulpini de bacterii lactice selectate și s-a determinat numărul de microorganisme într-un 1 ml de lapte. S-a stabilit că în laptele de capră s-a înregistrat cel mai înalt titru de celule viabile - 10^9 (tulpinile L56 și L61) și 10^{10} UFC·mL⁻¹ (tulpinile L14, L42, L46), ce este cu 1-2 ordine mai mult decât în laptele de vacă (fig. 3.3.).

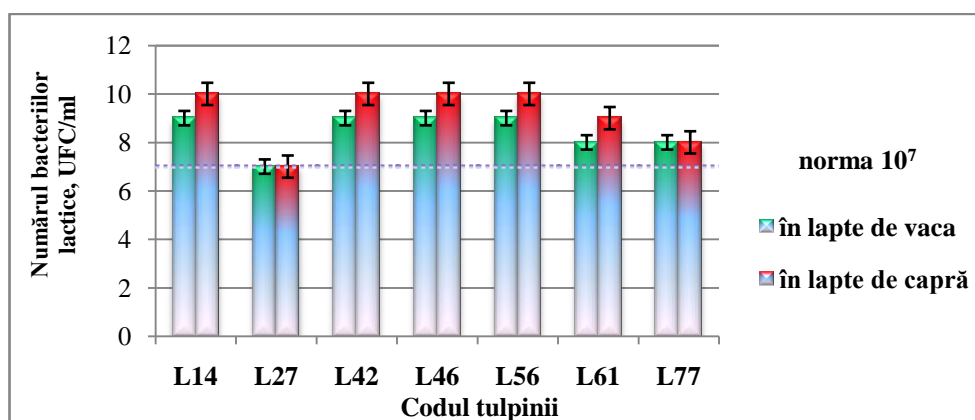


Fig. 3.3. Titru bacteriilor lactice studiate

Titru tulpinilor L27 și L77 nu a înregistrat diferențe semnificative în laptele de capră și de vacă și a fost de 10^7 - 10^8 UFC·mL⁻¹ pentru L27 și L77 respectiv, ceea ce este însă suficient pentru utilizarea lor în compoziția culturilor starter pentru obținerea produselor lactate [14, 15].

Datorită capacității de a produce acizi organici bacteriile lactice posedă proprietăți antimicrobiene față de microorganismele patogene și condiționat patogene. Astfel, utilizând metoda de difuzie în agar, a fost studiată activitatea antimicrobiană a bacteriilor selectate contra microorganismelor condiționat patogene *E. coli* ATCC® 25922™ și *S. aureus* ATCC® 25923™, care pot persista în lapte și post-pasteurizare [16] (tab. 3.4).

S-a stabilit că conform gradației Birgher [17] zona de inhibiție a creșterii *E. coli* variază între 10-21 mm și a *S. aureus* 9,5-19,5 mm, ce permite inhibarea dezvoltării infecțiilor intestinale. Aceste rezultate confirmă valoarea tulpinilor autohtone care s-au dovedit a fi mai active comparativ cu tulpinile descrise de alți autori. De exemplu, tulpinile *L. diacetylactis* 035ch și *S. thermophilus* 042k-2 au demonstrat activitate antimicrobiană mai scăzută față de microorganismele condiționat patogene [18] comparativ cu tulpinile selectate, iar tulpina *S. thermophilus* T2 nu a prezentat activitate inhibitoare împotriva *E. coli* și *S. aureus* [19].

Tabelul 3.4. Proprietățile antimicrobiene ale tulpinilor de bacterii lactice

Codul tulpinii	Test-cultura	
	<i>E. coli</i> ATCC® 25922™	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923™
	Diametrul zonei de inhibiție, mm	
L14	15,4±0,4	14,1±0,2
L27	11,1±0,2	9,5±0,3
L42	14,0±0,05	12,5±0,2
L46	14,5±0,2	14,1±0,2
L56	20,9±0,5	19,5±0,2
L61	13,2±0,4	12,1±0,3
L77	10,0±0,3	10,6±0,2

Cercetările efectuate demonstrează posibilitatea de selectare din surse autohtone a tulpinilor de bacterii lactice valoroase cu potențial tehnologic înalt și de utilizare a lor la fabricarea produselor lactate de calitate sigură [20].

În baza investigațiilor efectuate și a rezultatelor obținute tulpinile selectate de bacterii lactice *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *L.lactis* ssp.*cremoris* și *S. thermophilus* au fost depozitate în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene cu atribuirea numerelor de colecție: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* L 61 - CNMN-LB – 73; *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* L 42 - CNMN-LB – 74; *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* L 14 - CNMN-LB – 75; *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* L 77 - CNMN-LB – 76; *Lactococcus lactis* ssp.*cremoris* L 27 - CNMN-LB – 77; *Lactococcus lactis* ssp.*cremoris* L 46 - CNMN-LB – 78; *Streptococcus thermophilus* L 56 - CNMN-LB – 79.

3.4 Determinarea parametrilor biotehnologici optimi pentru culturile de bacterii lactice

Selectarea tulpinilor noi de bacterii lactice cu scopul elaborării culturilor starter biotehnologic active se bazează pe culturi pure care determină proprietățile organoleptice ameliorate ale produsului, cu efect pozitiv asupra sănătății umane. În acest scop, pentru determinarea eficacității dezvoltării bacteriilor lactice s-a studiat dinamica multiplicării tulpinilor selectate și evoluția acidității active în condiții de cultivare periodică în lapte degresat de capră la temperatura de 30±2°C (fig. 3.4., fig. 3.5.).

De asemenea s-a realizat analiza de regresie și elaborat modelul polinom care determină relația dintre schimbarea acidității active și titrul de celule viabile în dependență de durata de cultivare a tulpinilor, descrie exact rezultatele experimentelor și permite de a prognoza procesul de acidogeneză.

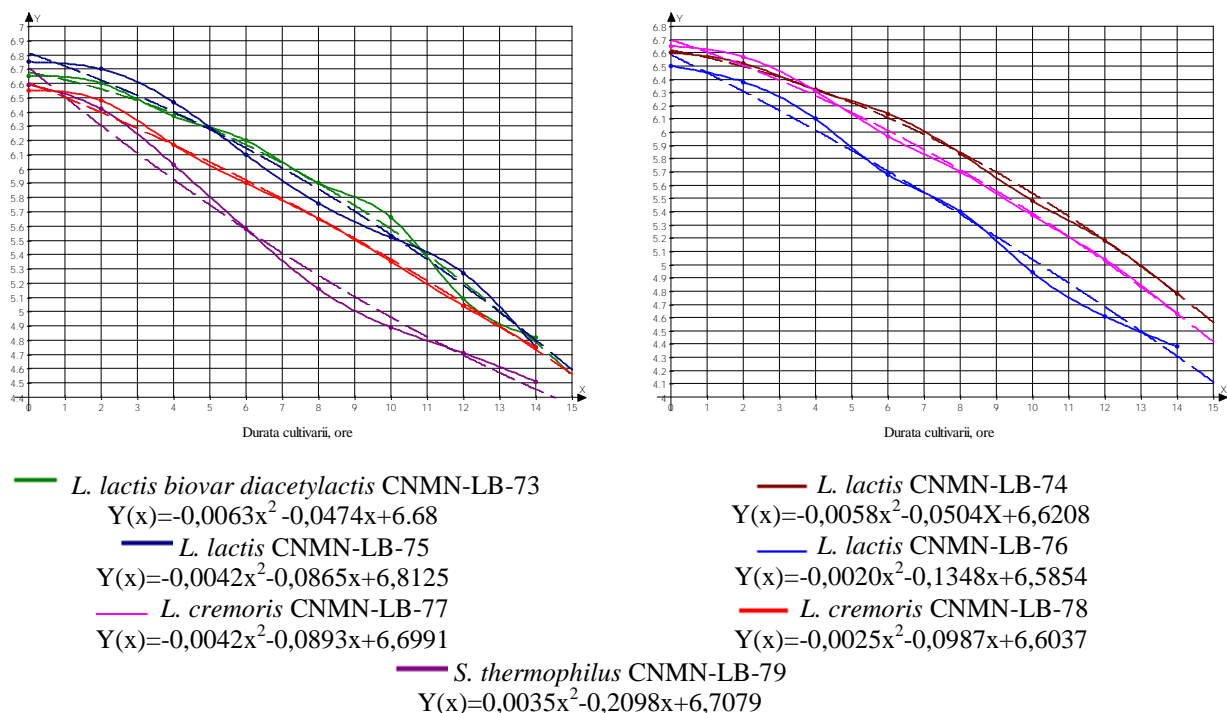


Fig. 3.4. Modificarea acidității active în procesul de cultivare a tulpinilor de bacterii lactice selectate în lapte de capră la temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$

Astfel, s-a stabilit că pentru toate tulpinile titrul înalt, de minimum $10^8 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, se atinge la sfârșitul fazei logaritmice de dezvoltare (14,0 ore de cultivare) la valoarea medie a pH-ului de 4,6 [21].

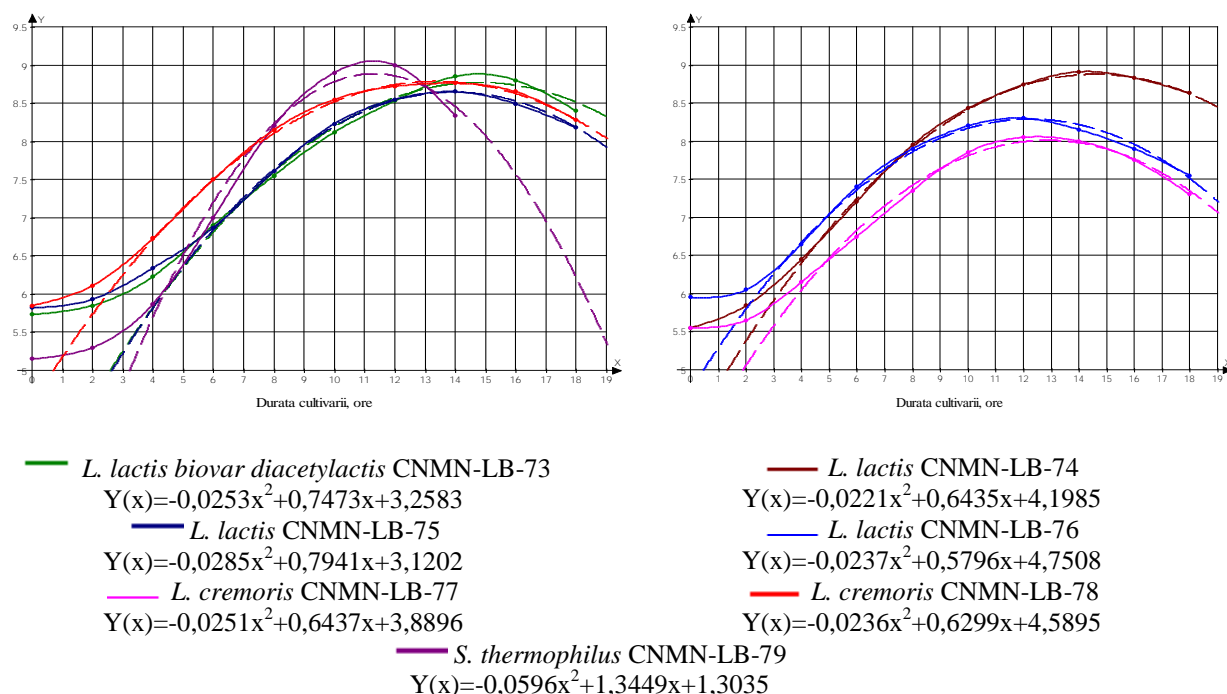


Fig. 3.5. Dezvoltarea tulpinilor de bacterii lactice la temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$

Deoarece bacteriile lactice, izolate din microflora spontană naturală, pot suferi variații a parametrilor biotehnologici pe parcursul procesului de cultivare și păstrare îndelungată este necesar de a determina stabilitatea activității biochimice și viabilitatea tulpinilor pe durata depozitării și păstrării tulpinilor la temperaturi joase [15]. Rezultatele cercetărilor privind determinarea acidității și titrului de celule viabile, în laptele de capră fermentat, după 28 zile de depozitare la temperatura de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ sunt prezentate în Figura 3.6. și Figura 3.7.

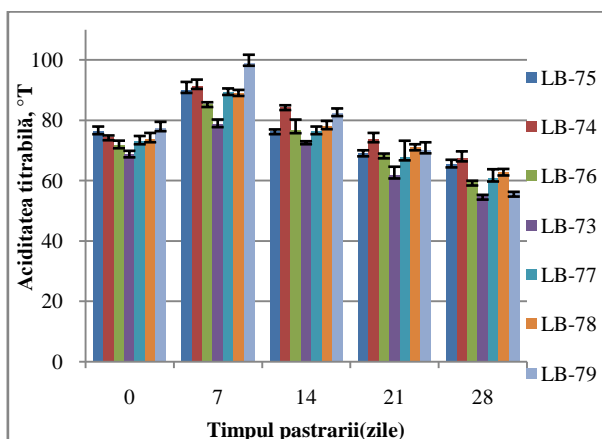


Fig. 3.6. Aciditatea titrabilă a laptelui fermentat în timpul depozitării

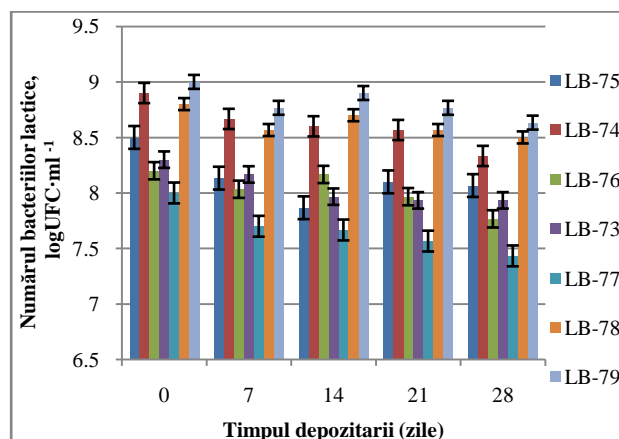


Fig. 3.7. Numărul de bacterii lactice viabile în timpul depozitării

Rezultate obținute confirmă păstrarea proprietăților biotehnologice și capacitatea sporită de regenerare a tulpinilor în mediu de lapte de capră, păstrându-se aciditatea moderată a laptelui fermentat la nivel de $88,9 - 78,1^{\circ}\text{T}$ și proprietățile probiotice ale tulpinilor [22].

3.5 Mediu nutritiv și de protecție pentru bacterii lactice izolate din laptele de capră

Pentru utilizarea industrială a microorganismelor, este necesară ameliorarea constantă a activității lor vitale, intensificarea proceselor de creștere și reproducere. Mediile de lapte degresat hidrolizat se utilizează pe scară largă pentru sporirea biomasei bacteriilor lactice și menținerea concentrației maxime a celulelor.

În baza cercetărilor efectuate s-a constatat că tulpinile autohtone de bacterii lactice selectate se dezvoltă mai intens în laptele de capră decât în laptele de vacă, de aceea au fost efectuate experiențe de determinare comparativă a parametrilor de creștere și dezvoltare a tulpinilor izolate: au fost studiate dinamica creșterii, aciditatea activă și titrul de celule viabile pe mediul de lapte de vacă și mediul de lapte de capră.

Tabelul 3.5. prezintă datele privind dezvoltarea tulpinilor selectate și acumularea biomasei în mediul de lapte de vacă și capră degresat după 24 ore de cultivare la temperatura $30\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tabelul 3.5. Titrul, acumularea biomasei și formarea acidului lactic pe medii nutritive

Tulpina	pH		Biomasa, mg/ml		Numărul bacteriilor lactice, UFC/ml	
	Mediul					
	de lapte de vacă	de lapte de capră	de lapte de vacă	de lapte de capră	de lapte de vacă	de lapte de capră
CNMN-LB-73	4,87±0,02	4,96±0,23	0,56	0,9	2,1×10 ⁹	2,7×10 ⁹
CNMN-LB-74	4,63±0,11	4,74±0,19	0,71	1,0	1,1×10 ⁹	3,5×10 ⁹
CNMN-LB-75	4,40±0,07	4,46±0,18	0,78	1,4	1,7 ×10 ⁹	3,8×10 ¹⁰
CNMN-LB-76	4,32±0,03	4,49±0,04	0,62	0,83	3,1×10 ⁸	5,0×10 ⁸
CNMN-LB-77	4,21±0,11	4,36±0,18	0,90	0,98	5,4×10 ⁷	1,1×10 ⁸
CNMN-LB-78	4,51±0,15	4,82±0,15	0,74	1,2	2,8×10 ⁹	5,9×10 ⁹
CNMN-LB-79	4,72±0,06	4,80±0,17	0,78	1,1	3,3×10 ⁹	3,6×10 ¹⁰

Analiza datelor obținute permite să afirmăm, că mediul nutritiv de lapte de capră are o influență semnificativă asupra viabilității tulpinilor selectate, ceea ce contribuie la sporirea proprietăților lor biotehnologice importante.

Optimizarea mediului de protecție pentru păstrarea tulpinilor selectate s-a efectuat prin elaborarea unui model matematic adecvat pentru calculul indicelui de viabilitate a bacteriilor, luând în considerare interacțiunile posibile între substanțele principale utilizate ale mediului.

În acest studiu, compoziția optimă a mediului protector a fost determinată cu aplicarea metodei de planificare matematică a experiențelor și s-a efectuat în comparație cu mediul clasic (lapte de vacă). Au fost obținute 9 mostre experimentale de tulpini liofilizate în corespundere cu matricea de planificare a experimentului factorial cu 2 factori. După prelucrarea datelor experimentale a fost alcătuită ecuația de regresie a conținutului mediului de protecție cu lapte de capră (1) și mediului cu lapte de vacă (2) care descrie veridic ($p < 0,05$) în valori reale modificarea viabilității bacteriilor lactice.

Astfel ecuația de regresie obținută este următoarea:

$$\text{Pentru lapte de capră } Y = 44,612 + 0,378L_c - 0,375C_s + 0,027L_c \times C_s \quad (1)$$

$$\text{Pentru lapte de vacă } Y = 49,15 + 0,20L_v - 8,77C_s + 0,13L_v \times C_s \quad (2)$$

unde:

Y – viabilitatea bacteriilor, %; L_c – conținutul de lapte de capră în mediul de protecție, %; L_v – conținutul de lapte de vacă în mediul de protecție, % ; C_s – conținutul de citrat de sodiu, %.

Analiza detaliată a ecuației 1 a permis determinarea cantității optime de substanțe protectoare pentru fabricarea concentratelor bacteriene în diapazonul declarat al conținutului de lapte de capră și citrat de sodiu în mediul protector.

Pentru păstrarea îndelungată a genofondului bacteriilor lactice izolate din lapte de capră a fost elaborată compoziția optimală a mediului protector determinată în baza experimentului

planificat ce conține 80% laptele degresat de capră cu 16% de substanțe uscate, 10% zaharoză, 2,5% citrat de sodiu, 5% gelatin și 2,5% glutamat de sodiu, ce asigură viabilitatea bacteriilor la nivel de 90% după liofilizare.

Vizualizarea grafică a ecuației polinomice 3.1 este prezentată în Figura 3.8.

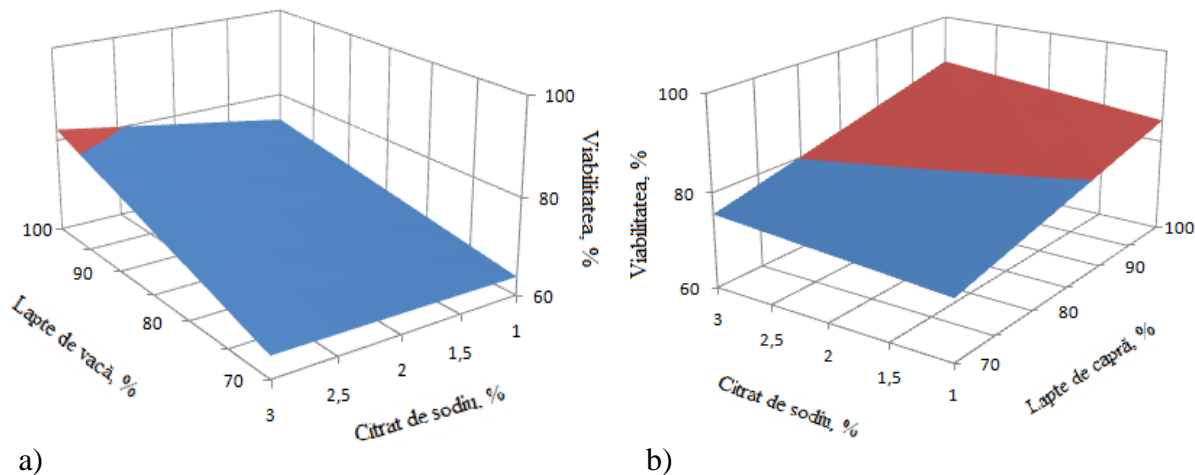


Fig. 3.8. Reprezentarea grafică a modelului matematic de viabilitate a bacteriilor lactice după liofilizare în mediul compus: a) din laptele de vacă degresat; b) din laptele de capră degresat

Analiza detaliată a ecuației 3.1 ne permite să afirmăm, că laptele de capră, atât în calitate de mediu nutritiv, cât și ca parte componentă a mediului protector are o influență semnificativă asupra productivității și viabilității culturilor de bacterii lactice izolate, ceea ce contribuie și la păstrarea proprietăților lor biotehnologice importante [23].

4. ELABORAREA TEHNOLOGIEI DE FABRICARE A BRÂNZEI CU APLICAREA CULTURII STARTER AUTOHTONE DE BACTERII LACTICE

4.1 Asocierea tulpinilor de bacterii lactice autohtone în cultura starter pentru fabricarea brânzei

Cercetările privind efectul liofilizării asupra indicilor biotehnologici (activitatea antimicrobiană, fermentativă și de acidulare) au permis selectarea celor mai active tulpini pentru crearea culturii starter, proprietățile valoroase ale cărora s-au păstrat timp de 6 luni de depozitare.

A fost creată o combinație compusă din 5 tulpini selectate CNMN-LB-73, CNMN-LB-74, CNMN-LB-75, CNMN-LB-77, CNMN-LB-79 și formată cultura starter pentru fabricarea brânzeturilor din lapte de capră. La elaborarea culturilor starter este important de a lua în considerare relația dintre tulpini și atingerea activității medii de acidifiere a laptelui timp de maximum 7 ore.

Lactococii reprezintă microflora principală care asigură formarea activă a acidului lactic de la începutul procesului de fermentare a laptelui și determină parametrii organoleptici ai produsului finit. Adăugarea în compoziția culturii starter pentru brânză a tulpinii *S. thermophilus*, de rând cu 2-3 tulpini de lactococi mezofili, contribuie la faptul că cultura starter este mai puțin afectată de bacteriofagi și devine mai rezistentă la variațiile sezoniere ale calității laptelui [9].

În baza asociațiilor formate, au fost alcătuite următoarele combinații de tulpini pentru culturi starter destinate fabricării brânzeturilor: 1) 25% (*L.lactis* CNMN-LB-74 + *L.lactis* CNMN-LB-75) + 25% *L. cremoris* CNMN-LB-78 + 25% *L. lactis* biovar *diacetylactis* CNMN-LB-73 + 25% *S. thermophilus* CNMN-LB-79; 2) 50% (*L.lactis* CNMN-LB-74 + *L.lactis* CNMN-LB-75) + 20% *L. cremoris* CNMN-LB-78 + 20% *L. lactis* biovar *diacetylactis* CNMN-LB-73 + 10% *S. thermophilus* CNMN-LB-79.

Rezultatele investigațiilor indicilor biotehnologici a combinațiilor formate din *L. lactis*, *L. cremoris*, *L. lactis* biovar *diacetylactis* și *S. thermophilus* demonstrează că cantitatea de zer eliminat la fermentarea laptelui de către combinația nr. 2 este mai înaltă comparativ cu cea stabilită la fermentarea laptelui cu tulpini aparte. Astfel, s-a dovedit efectul sinergic al combinației propuse în calitate de cultură starter pentru fabricarea brânzeturilor (tab. 4.1.).

Tabelul 4.1. Caracteristicile combinațiilor de tulpini lactice selectate pentru fabricarea brânzei

Cultură starter	Durata coagulării, ore	Aciditatea titrabilă, °T	Sinereza, ml	Aspectul coagulului
Nr.1	5,5±0,2	79±2,0	0	O, C, fZ,
Nr.2	6,0±0,5	86±1,5	2,3±1,2	O, D, Z

Notă: O – omogen, C-cremos, D – dens, Z- eliminarea zerului, fZ – fără eliminarea zerului

Combinația de culturi nr.1 manifestă coagulare mai activă a laptelui, comparativ cu nr.2, dar formează un coagul cremos fără eliminarea zerului, fenomen nedorit al unei culturii starter destinate fabricării brânzeturilor. Presupunem că acest fapt se datorează raportului cantitativ înalt (25%) a tulpinii *S. thermophilus* în cadrul combinației nr.1. În combinația nr. 2 raportul tulpinilor mezofile este mai mare, fapt ce a temperat dezvoltarea tulpinii termofile, ce permite majorarea sinerezei la fermentarea laptelui. Astfel, pentru cercetările ulterioare a fost selectată combinația nr. 2, denumită BriCheese.

În ambele combinații aciditatea titrabilă a fost în limitele admisibile – 79-87,5°T, aspectul frotiului microscopic a confirmat dezvoltarea tulpinilor conform raportului stabilit, combinațiile formate corespund cerințelor față de culturile starter pentru fabricarea produselor lactate fermentate.

Pentru a determina competitivitatea culturii starter elaborate s-au analizat proprietățile biotehnologice ale ei comparativ cu cele ale culturii starter de import CHOOZIT MA 4001/4002 LYO (tab. 4.2., fig. 4.1.).

Tabelul 4.2. Caracteristicile biotehnologice ale culturilor starter pentru brânză

Cultură starter	Caracteristicile biotehnologice			
	NMLV, logUFC/g	Aciditatea titrabilă a culturii, °T	Durata de coagulare a laptelui, ore	Sinereza, cm ³
BriCheese	9,731	34±1,0	6,0±0,5	2,2±0,5
CHOOZIT	8,825	41±0,5	7,0±0,2	1,5±0,5
Proprietățile antimicrobiene				
Test-cultura				
	<i>E. coli</i> ATCC® 25922™		<i>S. aureus</i> ATCC® 25923™	
Diametrul zonei de inhibiție, mm				
BriCheese	12,7±0,1		12,0±0,3	
CHOOZIT	5,9±0,2		4,1±0,05	

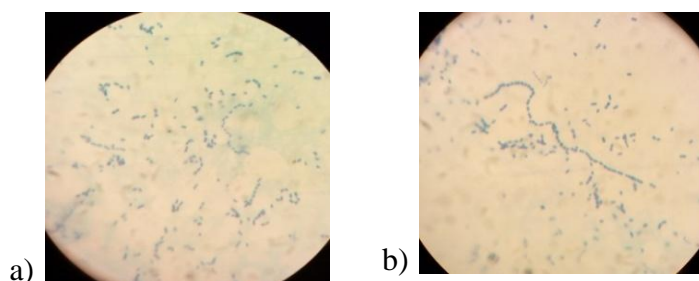


Fig. 4.1. Aspectul microscopic al culturilor starter, mărire x100:
a) CHOOZIT; b) BriCheese

Microflora mezofilă creează un miros clasic, de lapte fermentat, iar prezența tulpinii *L. lactis* biovar *diacetylactis* CNMN-LB-73 oferă un gust și aromă plăcută de compuși aromatici mai exprimată decât în cultura de import. Mai mult, activitatea antimicrobiană înaltă a culturii BriCheese este încă un avantaj în procesul de obținere a produsului finit de calitate și siguranță garantată, fapt ce influențează și procesul de maturare și depozitare a brânzei fabricate.

4.2 Implementarea culturii starter elaborate la fabricarea brânzei

În condiții industriale ale SRL “Major-Auto”, or. Taraclia, în baza tehnologiei elaborate de fabricare a brânzei din lapte de capră a fost produs un lot experimental de brânză sărată, folosind cultura starter mixtă BriCheese. Fermentația a fost efectuată la o temperatură de 30±2°C, după metoda tradițională – utilizarea cheagului și maieii bacteriene. 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. În continuare, brânzeturile obținute au fost supuse sărării, maturării, păstrării după care s-au studiat proprietățile senzoriale, fizico-chimice și microbiologice ale brânzei obținute.

4.3 Determinarea indicilor de calitate și a termenului de valabilitate ale brânzei din lapte de capră

Evaluarea calității brânzei fabricate în condițiile industriale cu utilizarea culturii starter BriCheese a fost inițiată prin studiul caracteristicilor organoleptice: consistența, aspectul exterior, gustul, mirosul, culoarea și textura brânzei și parametri fizico-chimici: fracția masică de grăsimi în substanța uscată, umiditate, NaCl.

În urma degustației s-a stabilit, că brânza fabricată cu aplicarea culturii starter BriCheese ce conține tulpini de *L. lactis biovar diacetylactis*, *L.lactis*, *L. cremoris*, *S. thermophilus* se caracterizează prin coagulul cu consistență densă, textura nesfărâmițoasă, omogenă, elastică, aspect poros cu ochiuri rotunde, ovale de formă neregulată, de culoare albă cu nuanța gălbuie, aromă specifică de brânză din lapte de capră, cu gust plăcut, sărat moderat fapt ce a fost confirmat de comisia de degustare din cadrul Direcției „Tehnologii Alimentare” a IȘPHTA.

Un indicator important la fabricarea brânzeturilor este sinereza – separarea zerului. Mostrele de brânză fabricată cu utilizarea culturii starter au manifestat separarea zerului în cantitate de peste 70%, fracția masică de grăsime în substanța uscată a constituit 46,3%, umiditate 53,1 %, fracția masică de NaCl - 3,5%.

A fost apreciată evoluția numărului de microorganisme lactice și scăderea acidității active în procesul de maturare și în produsul finit (fig. 4.3.).

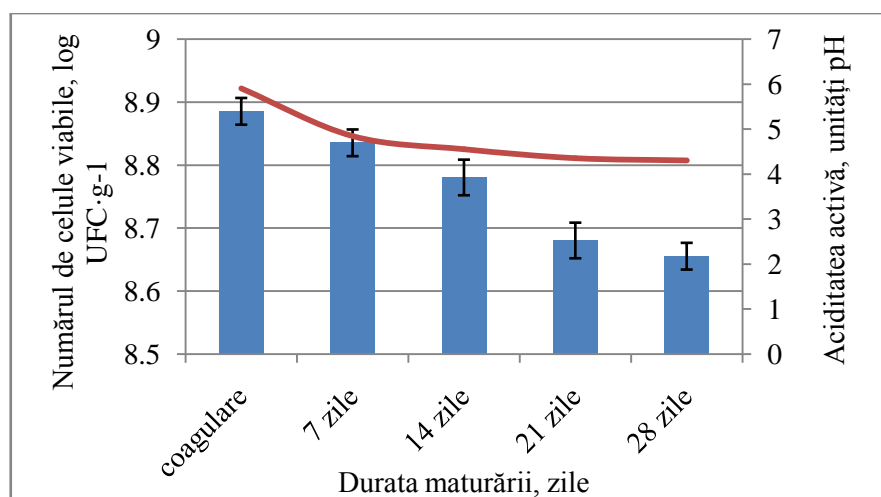


Fig. 4.3. Modificarea acidității active și titrului bacteriilor lactice pe parcursul maturării brânzei din lapte de capră

Brânza fabricată a demonstrat prezența unui număr mai mare de celule lactice $8,6 \pm 0,02$ lg UFC în 1 g de produs finit. Proprietățile deosebite ale culturii starter din tulpini autohtone de bacterii lactice sunt confirmate prin brevetul de invenție de scurtă durată MD 1299 Y din 2019.01.31 „Procedeu de obținere a brânzei din lapte de capră” [24].

Conform cerințelor stipulate în documentele normative pentru brânzeturi, nivelul de bacterii lactice în 1 g de produs finit trebuie să fie minim 10^7 UFC/g. În cazul nostru, putem constata că cultura starter elaborată asigură fabricarea produsului lactat cu microorganisme benefice din abundență. Din datele prezentate rezultă că la finalizarea procesului de maturare a brânzei, titrul celulelor lactice în mostre a rămas la un nivel ridicat (8,65 unități logaritmice) și corespund cerințelor indicate în „Reguli privind criteriile microbiologice pentru produsele alimentare” [25].

Rezultatele cercetărilor au fost servit drept reper în elaborarea Standardului de Firmă „Brânză în saramură din lapte de capră și de oaie. Condiții tehnice” SF 40388050-001:2017, Instrucțiunii Tehnologice IT MD 67-40388050-001:2017 corespunzătoare, precum și Standardului Moldovenesc „Brânză din lapte de capră și de oaie. Specificații”, care la momentul dat este la etapa de aprobare la Institutul de Standardizare din Moldova.

Cercetările privind determinarea termenului de valabilitate a brânzei fabricate au demonstrat, că utilizarea culturii starter elaborate, influențează semnificativ caracteristicile senzoriale, organoleptice și indicii de calitate ale produsului finit, numărul de bacterii lactice în mostrele după 90 zile de păstrare a rămas la nivel sporit, mai înalt decât limitele cerințelor normative – 10^8 UFC/g de produs, și a garantat o durată de păstrare îndelungată, fără a compromite siguranța în consum a produsului finit [26].

4.4. Fezabilitatea economică a fabricării brânzei din lapte de capră cu utilizarea culturii starter autohtone

De asemenea, a fost efectuat calculul economic care a stabilit că costul aproximativ a unui flacon (2 g) de concentrat bacterian pentru fabricarea brânzei constituie 3,74 lei ce este de 5 ori mai mic decât a culturii starter importate din străinătate, iar efectul economic anual la 1000 de flacoane fabricate pentru prețurile anului 2018 va constitui 16660 lei.

Costul aproximativ al unui kg de brânză din lapte de capră cu utilizarea culturii starter autohtone și cheagului constituie 133,8 lei, ce este mai ieftin comparativ cu cele prezente în rețelele naționale de comercializare.

CONCLUZII GENERALE

Realizarea cercetărilor și analiza rezultatelor obținute în cadrul tezei de doctor „Valorificarea tulpinilor microbiene izolate din lapte de capră pentru aplicare industrială” au condus la formularea următoarelor concluzii:

1. Tulpinile de bacterii lactice, izolate din lapte crud de capră din 12 regiuni ale Republicii Moldova prezintă caractere fenotipice ale subspeciilor *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, sunt adaptate la calitatea materiei prime și posedă caracteristici biotehnologice valoroase și stabile:
 - coagularea laptelui timp de 5-8 ore;
 - aciditatea moderată 68 - 93°T a laptelui fermentat, ce se păstrează pentru o perioadă îndelungată de depozitare;
 - cantitatea importantă de unități formatoare de colonii - 10^9 UFC în 1 ml de lapte fermentat [13, 14], [cap.3].
2. Tulpinile selectate manifestă activitate animicrobiană față de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*, contribuind la prevenirea dezvoltării infecțiilor intestinale și a patogenilor atât în probele de lapte, cât și în produsele lactate din lapte de capră [22, 26], [cap.3].
3. Mediul protector, elaborat în baza metodei matematice de planificare a experiențelor, conține un raport optimal de lapte degresat de capră (80%), citrat de sodiu (2,5%), zaharoză (10%), gelatină (5%), glutamat de sodiu (2,5%) și asigură viabilitatea bacteriilor lactice din lapte de capră la nivel de 90% după liofilizare și menținerea proprietăților biotehnologice a culturilor pe parcursul păstrării îndelungate [23], [cap.3].
4. Cultura starter autohtonă BriCheese, obținută prin asocierea tulpinilor selectate CNMN-LB-73, CNMN-LB-74, CNMN-LB-75, CNMN-LB-78 și CNMN-LB-79 posedă un potențial biotehnologic înalt la un preț de 5 ori mai mic în comparație cu cele provenite din import [cap.4].
5. Tehnologia de fabricare a brânzei din lapte de capră, reflectată în documentele normative și tehnice – Standardul Moldovenesc „Brânză din lapte de capră și de oaie. Specificații”, Standardul de Firmă „Brânză în saramură din lapte de capră și de oaie. Condiții tehnice” SF 40388050-001:2017 și Instrucțiunea Tehnologică IT MD 67-40388050-001:2017 și implementată în condiții industriale la întreprinderea SRL “Major-Auto”, asigură obținerea brânzei tradiționale din lapte de capră - produs ce se caracterizează prin coagul dens, consistență nesfărâmicioasă, moale, gust și miros ameliorat, termen de valabilitate îndelungat și conținut înalt de bacterii lactice viabile - 10^8 UFC/g pe durata păstrării [20, 24], [cap.4].

RECOMANDĂRI

În baza cercetărilor efectuate se recomandă:

1. Tulpinile de bacterii lactice de *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* CNMN-LB – 73, *L. lactis* ssp. *lactis* CNMN-LB – 74, *L. lactis* ssp. *lactis* CNMN-LB – 75, *L. lactis* ssp. *lactis* CNMN-LB – 76, *L. lactis* ssp. *cremoris* CNMN-LB – 77, *L. lactis* ssp. *cremoris* CNMN-LB – 78, *S. thermophilus* CNMN-LB – 79 cu proprietăți biotehnologice valoroase *se recomandă* pentru procesarea laptelui de capră la producerea industrială a culturilor starter destinate fabricării brânzeturilor;
2. Mediul nutritiv de lapte de capră și mediul optimizat pentru liofilizarea culturilor *se recomandă* pentru menținerea parametrilor productivi ai culturilor de bacterii lactice izolate din lapte de capră, depozitarea și păstrarea acestora în condiții de producere industrială;
3. Cultura starter elaborată, datorită competitivității și eficienței sale, *se recomandă* pentru utilizare la scară industrială - în procesul de fabricare a brânzeturilor din lapte de capră.

Rezultatele științifice principale care au contribuit la soluționarea problemei științifice importante constă în identificarea unor tulpini noi de bacterii lactice din specii *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, ceea ce a condus la elaborarea culturii starter autohtone cu potențial biotehnologic sporit pentru industria de procesare a laptelui de capră, fapt ce a permis eficientizarea procesului de fabricare a brânzeturilor.

Rezultatele au fost implementate în cadrul întreprinderilor de procesare a laptelui SRL „Prietenia-Agro” (or. Soroca) la fabricarea loturilor experimentale de lapte de capră de consum și SRL „Major-Auto” (or. Taraclia) la fabricarea loturilor experimentale de brânzeturi și utilizate în elaborarea Standardului Moldovenesc „Brânză din lapte de capră și de oaie. Specificații”.

Aportul personal. În materialele care reflectă conținutul brevetului de invenție autorului îi revine cota parte în corespundere cu lista autorilor. Toate celelalte rezultate obținute, analiza, generalizările și concluziile aparțin autorului.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. РЫЖКОВА, Т. Результаты исследований состава козьего молока и его микробиологических показателей, использованных при разработке Гост Украины. В: *SWORLD*. 2013. (citat 15.03.2018). Disponibil: <https://www.sworld.com.ua/index.php/ru/c113-5/16376-c113-222>.
2. *Anuarul Statistic al Republicii Moldova*. Chișinău: BIROUL NAȚIONAL DE STATISTICĂ AL REPUBLICII MOLDOVA, 2016. 410 p. ISBN 978-9975-53-766-7.
3. КОРНАБАЕВА, З. Изучение молочнокислых микроорганизмов, выделенных из кисломолочных продуктов Казахстана. В: *Журнал научных публикаций аспирантов и докторантов*. 2014, с.5. ISSN (Print) 1991-3087.
4. HOLZAPFEL, W.H., SHULINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. In: *Food Research International Journal*. 2002, vol.35. pp. 125-129. ISSN 0963-9969.
5. CHERIGUENE, A. et al. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from algerian goat's milk. In: *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2006, vol. 9 (7), pp.1242–1249. ISSN (Online) 1812-5735.
6. РЫЖКОВА, Т. Влияние комбинационных сочетаний заквасочной микрофлоры на качество и выход козьего творога. В: *SWORLD*. 2013. (citat 15.03.2018). Disponibil: <https://www.sworld.com.ua/konfer31/94.pdf>
7. GOST 3624-92. Lapte și produse lactate. Metode titrimetrice pentru determinarea aciditate. Chișinău: Departament "Moldova-Standard", 1992, 10 p.
8. БАННИКОВА, Л. *Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности*. Москва: Пищевая промышленность, 1975. 256 с.
9. *Сборник инструкций по селекции молочнокислых бактерий и бифидобактерий и подбору заквасок для кисломолочных продуктов*. Москва: ВНИИМС, 1986, 100 с.
10. SM SR EN ISO 5943 Brînză și produse din brînză procesată. Determinarea conținutului de cloruri. Metoda prin titrare potențiometrică. Chișinău: Institutul Național de Standardizare, 2012, 16 p.
11. SM SR EN ISO 5534:2014 Brînzeturi și brînzeturi procesate. Determinarea conținutului total de substanță uscată (Metoda de referință). Chișinău: INS, 2017, 21 p.
12. ДОСПЕХОВ, Б. *Методика полевого опыта*. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.
13. **BOGDAN, N.** Characteristics of lactic acid bacteria strains from Moldavian raw goat milk. In: *Journal of Science, Technique and Technologies Food and Packaging*. 2016, vol.9, p. 25, ISBN 1314-7773.
14. RUDIC, V., **BOGDAN, N.** Goat milk as a potential source of new prospective strains of lactic acid bacteria. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (3rd edition)*, 2016, Chisinau, p. 104. ISBN 978-9975-3129-3-6.
15. Hotărâre cu privire la aprobarea Cerințelor de calitate pentru lapte și produsele lactate Nr. 158 din 07.03.2019. În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 29.09.2019, Nr. 111-118.

16. HICKEY, C., SHEEHAN, J., WILKINSON, M., AUTY, M. Growth and location of bacterial colonies within dairy foods using microscopy techniques: a review. In: *Frontiers in Microbiology*. 2015, vol. 6(99), pp. 1-9. ISSN 1664302X.
17. БИРГЕР, М. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования*. Москва: Медицина, 1982. 461 с.
18. TULEMISSOVA, Z. et al. Selection of starter cultures for the fermentation of mare, camel and goat milk. In: *Journal of International Scientific Publications, Agriculture & Food*. 2016, vol. 4, pp. 639-645. ISSN (online) 1314-8591.
19. 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 (4), pp. 308–313. ISSN (Online) 2333-1240.
20. **BOGDAN, N.** et al. Process for producing brine cheese from goat milk with extended shelf life. In: *Proceedings of the 10th edition of European Exhibition of Creativity and Innovation*. Iași: StudIS, 2018, p. 234. ISSN 2601-4564.
21. **BOGDAN, N.** Biotechnological parameters determination for cultivation of lactic acid bacteria from goat milk. In: *Ukrainian Food Journal*. 2018, nr.7(4), pp.605-614. ISSN 2313–5891 (Online), ISSN 2304–974X (Print) DOI: 10.24263/2304-974X-2018-7-4-6.
22. **BOGDAN, N.** Cultura mixtă din tulpini autohtone de bacteria lactice pentru fermentarea laptelui de capră. În: *Revista Pomicultura, Viticultura & Vinificația*. 2018, vol. 1-2 (73-74), pp. 68-71. ISSN 1857-3142.
23. **BOGDAN, N.** High viability of lactic acid bacteria in culture-protective medium through mathematical modeling. In: *Proceedings of International scientific Conference on Microbial Biotechnology, 4rd edition*, october 11-12, 2018, pp. 70-71, Chișinău, Republic of Moldova. ISBN 978-9975-3178-8-7.
24. **BOGDAN, N.,** NECRÎLOVA, L., CARTAȘEV, A., COEV, Gh., RUDIC, V. *Procedeu de obținere a brânzei din lapte de capră*. Brevet de invenție MD 1299 Y A23C 19/032, A23C 19/05, A23C 19/064, A23C 19/068. Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare. Nr. depozit s 2018 0017. Data depozit 15.03.18. Publicat 31.01.2019. In: BOPI. 2019.
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. **BOGDAN, N.** Searching of potential autochthonous lactic acid bacteria for goat milk fermentation. In: *Catalogul Salonului Ugal Invent, ediția a III-a*, octombrie 19 - 20, 2017, p. 85, Galați, România. ISSN 978-606-696-091-5.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI

2. Articole în reviste științifice

2.1. în reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS

1. **BOGDAN, N.** Biotechnological parameters determination for cultivation of lactic acid bacteria from goat milk. In: *Ukrainian Food Journal*, 2018, Nr.7(4), p.605-614. ISSN 2313–5891 (Online), ISSN 2304–974X (Print) DOI: 10.24263/2304-974X-2018-7-4-6.

2.2. în reviste din străinătate recunoscute

2. **BOGDAN, N.** Characteristics of lactic acid bacteria strains from Moldavian raw goat milk. In: *Journal of Science, Technique and Technologies Food and Packaging*, 2016, v.9, p. 25, ISBN 1314-7773.

2.3. în reviste din Registrul Național al revistelor de profil

3. **BOGDAN, N., RUDIC, V., COEV, G.** Actualitatea studiului laptelui de capră ca sursa de izolare a tulpinilor de bacterii lactice. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științe Vietii*, 2016, № 3 (330), p. 150-156. ISSN 1857-064X. *categoria B*
4. **BOGDAN, N.** Cultura mixtă din tulpini autohtone de bacteria lactice pentru fermentarea laptelui de capră. În: *Revista Pomicultura, Viticultura&Vinificatia*, 2018, v. 1-2 (73-74), p. 68-71. ISSN 1857-3142. *categoria C*

3. Articole în culegeri științifice

3.1 în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

5. **BOGDAN, N.** Composition and characteristics of goat milk: a review. In: *Proceedings of International Conference „Modern technologies in the food industry-2016”*, Chișinău, Moldova, 20-22 october, 2016, p. 135. ISBN 978-9975-87-138-9.

3.2. în lucrările conferințelor științifice naționale cu participare internațională

6. **BOGDAN, N.** Biotechnological potential of autochthonous lactic acid bacteria isolated from raw goat milk. In: *Materialele Conferinței Științifice cu participare internațională a doctoranzilor „Tendinte contemporane ale dezvoltarii stiintei: viziuni ale tinerilor cercetatori”*, editia V-a, Chisinau, Moldova, 25 mai 2016, p. 140. ISBN 978-9975-3054-5-7.
7. **BOGDAN, N.** Goat milk – actual direction in dairy industry. In: *Materialele Conferinței Științifice cu participare internațională a doctoranzilor „Tendinte contemporane ale dezvoltarii stiintei: viziuni ale tinerilor cercetatori”*, editia a VI-a, Chisinau, Moldova, 2017, p. 171-176. ISBN 978-9975-108-16-4.
8. **BOGDAN, N.** The potential of goat milk for new products. In: *Materialele Conferinței Științifice nationale cu participare internațională „Știința și Inovarea în Nordul Republicii Moldova: probleme, realizari, perspective”*, Balti, Moldova, 2015, p. 45. ISBN 978-9975-3054-5-7.

4. Teze în culegeri științifice

4.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

9. **BOGDAN, N.** Analysis of high biological properties of goat milk. In: *Book of abstract: 83 International scientific conference of young scientist and students “Youth scientific*

achievements to the 21st century nutrition problem solution” Part 1, NUFT, Ukraine, Kiev, 2017, p. 339.

10. **BOGDAN, N.** Cultural properties of lactic acid bacteria isolated from goat milk. In: *Book of abstract 83 International scientific conference of young scientist and students “Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution”* Part 1, NUFT, Ukraine, Kiev, 2017, p. 341.
11. **БОГДАН, Н., КОЕВ, Г.** Биоразнообразиие молочнокислых бактерий козьего молока. В: *Сборник тезисов III Международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов*, Россия, Новосибирск, 2016, с. 6. ISBN 978-5-4437-0563-7.
4.2 în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)
12. **RUDIC, V., BOGDAN, N.** Goat milk as a potential source of new prospective strains of lactic acid bacteria. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (3rd edition) dedicated to the 70th anniversary of foundation of first research institutions and the 55th anniversary of the inauguration of the Academy of Sciences of Moldova*, 2016, Chisinau, p. 104. ISBN 978-9975-3129-3-6.
13. **BOGDAN, N.** High viability of lactic acid bacteria in culture-protective medium through mathematical modeling. In: *Proceedings of International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 4rd edition*, Chișinău, Moldova, october 11-12, 2018, p. 70-71. ISBN 978-9975-3178-8-7.

6. Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții

6.1. Brevet de invenție

14. **BOGDAN, N., NECRÎLOVA, L., CARTAȘEV, A., COEV, GH., RUDIC, V.** *Procedeu de obținere a brânzei din lapte de capră*. Brevet de invenție MD 1299 Y A23C 19/032, A23C 19/05, A23C 19/064, A23C 19/068. Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare. Nr. depozit s 2018 0017. Data depozit 15.03.18. Publicat 31.01.2019. In: BOPI. 2019.

6.2. Materiale la saloanele de invenții

15. **BOGDAN, N., NECRÎLOVA, L., CARTAȘEV, A., COEV, GH., RUDIC, V.** Process for producing brine cheese from goat milk with extended shelf life. In: *Proceedings of the 10th edition of European Exhibition of Creativity and Innovation*, România, Iași, 2018, p. 234. ISSN 2601-4564.
16. **BOGDAN, N.** Searching of potential autochthonous lactic acid bacteria for goat milk fermentation. În: *Catalogul Salonului Ugal Invent*, ediția a III-a, 19 – 20 Octombrie 2017, Galați, România, p. 85. ISSN 978-606-696-091-5.
17. **BOGDAN, N., NECRÎLOVA, L., CARTAȘEV, A., COEV, GH., RUDIC, V.** Process for producing brine cheese from goat milk with extended shelf life. In: *Proceedings of the 22nd International Exhibition of Inventics “INVENTICA 2018”*, România, Iași, p. 381. ISSN 1844-7880.

ADNOTARE

BOGDAN Nina: „Valorificarea tulpinilor microbiene izolate din lapte de capră pentru aplicare industrială”, teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2019.

Structura tezei: introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 179 titluri, 13 anexe, 127 de pagini de text de bază, 23 figuri, 27 tabele (fără evidența anexelor). Rezultatele obținute sunt publicate în 17 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: bacterii lactice, tulpini autohtone, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, cultură starter, lapte de capră, brânză.

Scopul lucrării: selectarea tulpinilor de bacterii lactice cu potențial biotehnologic valoros pentru industria laptelui și utilizarea lor în compoziția culturilor starter destinate fabricării produselor lactate din lapte de capră.

Obiectivele cercetărilor: izolarea culturilor pure de bacterii lactice din lapte crud de capră; identificarea tulpinilor izolate conform studiului caracteristicilor morfologice, culturale, fiziologice și biochimice; studiul proprietăților biotehnologice și selectarea tulpinilor de bacterii lactice tehnologic valoroase pentru industria laptelui; aplicarea tulpinilor selectate în compoziția culturilor starter destinate fabricării brânzei din lapte de capră; elaborarea tehnologiei de obținere a brânzei din lapte de capră.

Noutatea și originalitatea științifică: pentru industria produselor lactate au fost propuse tulpini noi de bacterii lactice cu potențial biotehnologic înalt, izolate din lapte crud de capră din diferite zone ale R. Moldova. În baza tulpinilor selectate a fost elaborată cultura starter autohtonă nouă pentru fabricarea brânzei ce se caracterizează prin activitate înaltă de fermentare a laptelui de capră.

Rezultatul obținut care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante în teză constă în selectarea unor tulpini noi de bacterii lactice mezofile și termofile de importanță tehnologică, ceea ce a condus la elaborarea culturii starter autohtone pentru obținerea brânzeturilor din lapte de capră, fapt ce a permis eficientizarea procesului de fabricare a produselor lactate fermentate din lapte de capră.

Semnificația teoretică: au fost acumulate rezultate noi referitor la biodiversitatea tulpinilor autohtone izolate din lapte crud de capră din diferite zone ale R. Moldova; a fost argumentată științific perspectiva utilizării culturii starter autohtone de bacterii lactice pentru prepararea brânzei din lapte de capră; au fost propuse: un mediu nutritiv nou și un mediu nou de protecție pentru liofilizarea culturilor de bacterii lactice din lapte de capră. Proprietățile tehnologice performante ale tulpinilor noi sunt confirmate prin brevetul de invenție MD 1299 Y din 2019.01.31 „Procedeu de obținere a brânzei din lapte de capră”.

Valoarea aplicativă: elaborarea culturii starter autohtone pentru fabricarea produselor lactate fermentate din lapte de capră pe baza asociației mixte de tulpini noi de bacterii lactice izolate din lapte crud de capră, depozitate în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene, precum și elaborarea documentului tehnico-normativ Standardul Moldovenesc „Brânză din lapte de capră și de oaie. Specificații”.

Implementarea rezultatelor științifice: rezultatele cercetărilor au fost implementate în cadrul întreprinderilor de procesare a laptelui SRL „Prietenia-Agro” (or. Soroca, R. Moldova) la fabricarea loturilor experimentale de lapte de capră de consum și la SRL „Major-Auto” (or. Taraclia, R. Moldova) la fabricarea loturilor experimentale de brânzeturi și utilizate în elaborarea Standardului Moldovenesc „Brânză din lapte de capră și de oaie. Specificații”.

АННОТАЦИЯ

БОГДАН Нина: „Промышленное применение микробных штаммов, выделенных из козьего молока”, диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, Кишинев, 2019.

Структура диссертации: введение, четыре главы, общее заключение и рекомендации, список литературы из 179 библиографических источников, 13 приложений, 127 страницы базового текста, 23 рисунка, 27 таблиц (без учета приведенных в приложениях). Полученные результаты отражены в 17 научных работах.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, местные штаммы, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, стартерная культура, козье молоко, брынза.

Цель исследований: отбор штаммов молочных бактерий с ценным для молочной промышленности биотехнологическим потенциалом и их использование в составе стартовых культур для производства молочных продуктов из козьего молока.

Задачи исследований: отбор молочных культур из сырого козьего молока; морфокультуральная и физиолого-биохимическая идентификация отобранных штаммов; изучение биотехнологических свойств и отбор штаммов молочнокислых бактерий ценных для молочной промышленности; применение выбранных штаммов для создания стартерной культуры для производства брынзы из козьего молока; разработка технологии производства брынзы из козьего молока.

Научная новизна и оригинальность: были предложены для использования в молочной промышленности новые штаммы молочнокислых бактерий с высоким биотехнологическим потенциалом, выделенные из сырого козьего молока. На основе выбранных штаммов была составлена новая местная стартерная культура для производства брынзы, характеризующаяся высокой ферментативной активностью.

Результат, который способствует решению научной проблемы в диссертации состоит в селекции новых штаммов мезофильных и термофильных молочнокислых бактерий с технологической ценностью, что привело к созданию местной стартерной культуры для получения брынзы из козьего молока, и позволило повысить эффективность процесса производства ферментированных молочных продуктов из козьего молока.

Теоретическая значимость: были накоплены новые данные о биологическом разнообразии местных штаммов молочнокислых бактерий козьего молока; была аргументирована с научной точки зрения, возможность использования местной стартерной культуры молочнокислых бактерий для приготовления брынзы из козьего молока. Были предложены новая питательная среда и новая защитная среда для лиофилизации молочнокислых бактерий из козьего молока. Технологические свойства штаммов подтверждены патентом MD 1299 Y от 2019.01.31 „Способ получения рассольной брынзы из козьего молока”.

Практическая ценность работы: разработка отечественной стартерной культуры для выработки ферментированных продуктов из козьего молока, а также Государственного Стандарта „Брынза из козьего и овечьего молока. Технические условия.”

Внедрение научных результатов: результаты проведенных исследований были внедрены в рамках предприятия по переработке молока SRL „Prietenia-Agro” (г.Сороки, Р. Молдова) посредством изготовления промышленной партии питьевого козьего молока и SRL „Major-Auto” (г. Тараклия, Р. Молдова) в производстве рассольной брынзы, также использованы в разработке Государственного Стандарта „Брынза из козьего и овечьего молока. Технические условия”.

ABSTRACT

BOGDAN Nina: "Isolation of microbial strains from goat's milk for industrial application", *PhD thesis in biological sciences*, Chisinau, 2019.

Thesis structure: Introduction, four Chapters, General Conclusions and Recommendations, 179 of bibliographic sources, 13 Appendices, main text 127 pages, 23 figures, 27 tables (without those from annexes). The results were published in 17 scientific papers.

Keywords: lactic acid bacteria, indigenous strains, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, starter culture, goat milk, white brined cheese.

Research goal: selection of lactic bacteria strains with valuable biotechnological potential for the dairy industry and their use in the composition of starter cultures for the production of dairy products from goats' milk.

The objectives of the study: isolation of pure lactic culture from raw goat milk; identification of isolated strains according to the study of morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics; study of biotechnological properties and selection of valuable lactic bacteria strains for the milk industry; application of the strains selected in the composition of the starter cultures for the production of white brined cheese from goat's milk; developing the technology for the production of goat's milk cheese.

Scientific novelty and originality: new strains of lactic acid bacteria with high biotechnological potential, isolated from raw goat milk 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 culture with high milk fermentation activity were developed for the preparation of cheese from goat milk.

The result that contributes to solving an important scientific problem in the thesis consists in selection of new strains of mesophilic and thermophilic lactic acid bacteria of technological importance which led to development of the autochthonous starter culture for goat's cheese production and allowed to to efficiency streamline process of fermented dairy products from goat milk.

Theoretical value: accumulation of new data on the biodiversity of indigenous strains of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk from different regions of the Republic of Moldova; the scientific argumentation of the use of autochthonous starter culture based on lactic acid bacteria for the preparation of cheese from goat milk. A new nutrient medium and a new protective environment medium have been proposed for the freeze-drying of lactic acid bacteria from goat milk. Technology advantages of starter culture applied is confirm in patent MD 1299 Y at 2019.01.31 „Process for producing brine cheese from goat milk”.

Applicative value: elaboration of the starter culture for the fermented dairy products preparation from goat milk and National Standard ”Goat and sheep milk cheeses. Specifications.”

Implementation of scientific results: results of the studies were implemented within the milk processing industries SRL "Prietenia-Agro" (Soroca city, R. Moldova) through the production of an industrial batch of pasteurized goat milk and SRL "Major-Auto" (Taraclia city, R. Moldova) in the production of white brined cheese, and also used in the development of National Standard "Goat and sheep milk cheeses. Specifications".

BOGDAN NINA

**VALORIFICAREA TULPINILOR MICROBIENE IZOLATE DIN
LAPTE DE CAPRĂ PENTRU APLICARE INDUSTRIALĂ**

167.01 - BIOTEHNOLOGIE, BIONANOTEHNOLOGIE

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 29.10.2019

Formatul hîrtiei 60x84 1/16

Hîrtie ofset. Tipar ofset.

Tiraj 50 ex.

Coli de tipar.: 1,87

Comanda nr. 103/19

Centrul Editorial-Poligrafic al Universității de Stat din Moldova
str. A. Mateevici 60, Chișinău, MD-2009