

**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

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific:



RUDIC Valeriu,
dr. hab. șt. biol., prof. univ., acad.,
Om emerit al Republicii Moldova

Autor:



BOGDAN Nina

CHIȘINĂU, 2019

© Bogdan Nina, 2019

CUPRINS

ADNOTARE (în română, rusă și engleză)	5
LISTA TABELELOR	8
LISTA FIGURILOR	9
LISTA ABREVIERILOR	10
INTRODUCERE	11
1. LAPTELE DE CAPRĂ ȘI BACTERIILE LACTICE UTILIZATE LA FABRICAREA BRÂNZETURILOR	19
1.1 Caracteristicile laptelui de capră în calitate de aliment și sursă naturală de izolare a bacteriilor lactice	19
1.2 Bacteriile lactice și căile lor metabolice de transformare a substratului.....	27
1.3 Culturi starter de bacterii lactice utilizate la fabricarea brânzeturilor	31
1.4 Tehnologia de fabricare a brânzei din lapte de capră	36
1.5 Concluzii la capitolul 1	42
2. OBIECTELE DE STUDIU ȘI METODELE APLICATE ÎN CERCETARE	44
2.1 Obiectele de cercetare	44
2.2 Mediile nutritive utilizate în studiu.....	46
2.3 Metodele de cercetare	48
2.4 Concluzii la capitolul 2	66
3. SELECTAREA TULPINILOR AUTOHTONE DE BACTERII LACTICE DIN LAPTE DE CAPRĂ	67
3.1 Izolarea culturilor pure de bacterii lactice	68
3.2 Caracteristicile morfo-culturale și fiziologo-biochimice ale tulpinilor autohtone.....	70
3.3 Proprietățile tehnologice ale tulpinilor autohtone de bacterii lactice	77
3.4 Determinarea parametrilor biotehnologici optimi pentru culturile de bacterii lactice.....	81
3.5 Mediul nutritiv pentru cultivarea bacteriilor lactice izolate din laptele de capră	87
3.6 Optimizarea mediului de protecție pentru liofilizarea tulpinilor de bacterii lactice	89
3.7 Concluzii la capitolul 3	93
4. ELABORAREA TEHNOLOGIEI DE FABRICARE A BRÂNZEI CU APLICAREA CULTURII STARTER AUTOHTONE DE BACTERII LACTICE	95
4.1 Asocierea tulpinilor de bacterii lactice autohtone în cultura starter pentru fabricarea brânzei.....	97
4.2 Aprecierea calității laptelui de capră- materie primă la fabricarea brânzeturilor	103
4.3 Includerea culturii starter elaborate în procesul tehnologic de fabricare a brânzei	106
4.4 Determinarea indicilor de calitate și a termenului de valabilitate ale brânzei din lapte de capră	112
4.5 Fezabilitatea economică a fabricării brânzei din lapte de capră cu utilizarea culturii starter autohtone.....	118
4.6 Concluzii la capitolul 4	123
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	124

BIBLIOGRAFIE	128
ANEXE	128
Anexa 1 Brevet de invenție de scurtă durată MD 889 „Procedeu de obținere a brânzei și a băuturii din zer acid (variante)”	144
Anexa 2 Proces verbal de fabricare a loturilor experimentale de bacterii lactice (7 tulpini) din speciile <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> și <i>Streptococcus thermophilus</i>	146
Anexa 3 Certificat de testare industrială a tulpinilor în cadrul SRL „Major-Auto” (or. Taraclia, Republica Moldova) din 23.03.2017	147
Anexa 4 Adeverințe de depozitare a tulpinilor autohtone noi de bacterii lactice.....	149
Anexa 5 Proces verbal de producere a culturii starter, eliberat de DTA a IP IȘPHTA la 06.06.2017	156
Anexa 6 Act de implementare a tehnologiei pentru fabricarea laptelui de vacă și laptelui de capră de consum pasteurizat eliberat de SRL „Prietenia-Agro” (or.Soroca, Republica Moldova) la 15.03. 2017	157
Anexa 7 Standard de firmă SF 40388050-001:2017 pentru fabricarea brânzei din lapte de capră și de oaie	158
Anexa 8 Act de implementare a tehnologiei pentru fabricarea brânzei din lapte de capră și lapte de oaie eliberat de SRL„Major-Auto”(or.Taraclia, Republica Moldova) la 31.05.2017	160
Anexa 9 Act de implementare a culturii starter în cadrul SRL „Major-Auto” (or. Taraclia, Republica Moldova) din 30.06.2017	161
Anexa 10 Brevet de invenție MD 1299 Y „Procedeu de obținere a brânzei din lapte de capră”. Nr. depozit s 2018 0017. Data depozit 15.03.18. Publicat 31.01.2019	162
Anexa 11 Extras din Procesul verbal de degustare a sortimentului de brânzeturi din lapte de capră cu conținut de cultura starter din tulpini autohtone	164
Anexa 12 Darea de seama referitor la determinarea termenului de valabilitate pentru brânza fabricată cu cultura starter autohtonă din tulpini de bacterii lactice.....	166
Anexa 13 Premiul special Infoinvent 2017	167
Declarația privind asumarea răspunderii	167
CV-ul autorului.....	169

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 capra, 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 laptele 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; морфо-культуральная 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 125 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 indystries SRL "Prietenia-Agro" (Sorocea 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".

LISTA TABELELOR

Nr. d/o	Denumirea tabelului	Numărul paginii
1.1	Culturi starter de bacterii lactice utilizate la fabricarea brânzeturilor	35
2.1	Calculul intervalelor de încredere	62
2.2	Tabelul rezumativ al extremelor pentru estimarea numărului de bacterii lactice cultivate la temperatură $30\pm 2^{\circ}\text{C}$	63
2.3	Matricea-sistem a experiențelor pentru optimizarea mediului protector	64
3.1	Originea tulpinilor studiate	69
3.2	Proprietățile fiziologo-biochimice ale tulpinilor de bacterii lactice izolate din lapte de capră	75
3.3	Fermentarea carbohidraților de către tulpinile de bacterii lactice izolate din lapte de capră	76
3.4	Viteza de fermentare a laptelui de către tulpinile în studiu	78
3.5	Acumularea acidului lactic sub acțiunea tulpinilor studiate și numărul de microorganisme într-un 1 ml de lapte fermentat	78
3.6	Proprietățile antimicrobiene ale tulpinilor de bacterii lactice studiate	80
3.7	Indicatori ai creșterii, formării de acid și a creșterii biomasei în medii nutritive	88
3.8	Parametrii cinetici ai creșterii exponențiale a tulpinii CNMN-LB-75	89
3.9	Proprietățile antimicrobiene ale tulpinilor de bacterii lactice reactivate	93
4.1	Caracteristicile tehnologice ale culturilor liofilizate de bacterii lactice	99
4.2	Caracteristicile asociațiilor de tulpini autohtone pentru brânză	100
4.3	Caracteristicile biotehnologice ale culturilor starter pentru brânză	102
4.4	Dinamica numărului de bacterii lactice viabile în procesul de păstrare	103
4.5	Caracteristicile organoleptice, fizico-chimice și microbiologice a mostrelor de lapte crud	104
4.6	Rețete de producere a brânzei (pentru 100 kg de produs finit fără evidența pierderilor)	108
4.7	Caracteristicile fizico-chimice ale mostrelor de brânză	113
4.8	Caracteristica microbiologică a mostrelor de brânză	115
4.9	Dinamica indicilor de calitate pe parcursul termenului de valabilitate a brânzei	116
4.10	Calcularea consumului materiei prime și materialelor de bază pentru obținerea 1 kg concentrat bacterian	119
4.11	Calcularea consumului materiei prime și materialelor de bază pentru liofilizarea 1kg de concentrat bacterian	119
4.12	Consumul materialelor auxiliare	119
4.13	Calculul consumului materiei prime și materialelor de bază pentru 100 kg de brânză din lapte de capră	122
4.14	Consumul materialelor auxiliare	122

LISTA FIGURILOR

Nr. d/o	Denumirea figurii	Numărul paginii
1.1	Principalii constituenți chimici ai laptelui	21
1.2	Căile metabolice la bacteriile lactice homofermentative și heterofermentative	29
1.3	Fluxul tehnologic general de fabricare a brânzei	38
2.1	Schema cercetărilor ale izolatelor de bacterii lactice	44
2.2	Schema etapelor de selectare a tulpinilor de bacterii lactice de importanță biotehnologică	45
2.3	Aparataj utilizat pentru determinarea conținutului de lactoză	54
2.4	Schema de obținere a culturii starter pentru brânză	55
2.5	Aparataj utilizat pentru cultivarea, concentrarea și liofilizarea bacteriilor lactice	59
3.1	Aspectul coloniilor de bacterii lactice	71
3.2	Aspectul microscopic al tulpinilor	72
3.3	Testul de coagulare/reducere a laptelui turnesolat la temperatura de 45°C	73
3.4	Modificarea acidității active în procesul de cultivare a tulpinilor de bacterii lactice selectate în laptele de capră la temperatura de 30±2°C	82
3.5	Dezvoltarea tulpinilor de bacterii lactice la temperatura de 30±2°C	84
3.6	Aciditatea titrabilă a laptelui fermentat în timpul depozitării	86
3.7	Numărul de bacterii lactice viabile în timpul depozitării	86
3.8	Dinamica dezvoltării tulpinii CNMN-LB-75 și acumulării biomasei în mediile nutritive la temperatura 30±2°C	88
3.9	Reprezentarea grafică a modelului matematic de viabilitate a bacteriilor lactice după liofilizare în mediul compus	91
3.10	Modificarea acidității active a laptelui de capră fermentat cu tulpini de bacterii lactice cultivate timp de 24 ore	92
4.1	Aspectul microscopic al asociațiilor formate, mărirea x100	101
4.2	Aspectul microscopic al culturilor starter, mărirea x100	102
4.3	Cromatografie lichidă	105
4.4	Profilul senzorial al brânzei din lapte de capră cu aplicare culturii BriCheese	113
4.5	Modificarea acidității active și numărului de bacterii lactice pe parcursul maturării brânzei din lapte de capră	114

LISTA ABREVIERILOR

IȘPHTA – Institutul Științifico-practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare;
MSMPS – Ministerul Sănătății, Muncii și Protecției Sociale;
GOST – Standard al Federației Ruse;
HG – Hotărâre de Guvern;
ISO - Organizația Internațională de Standardizare;
NMMAFA – numărul de microorganisme mezofile aerobe și facultativ anaerobe;
SM – Standard Moldovenesc;
SUD – conținutul de substanțe uscate degresate, (%);
UFC – unități formatoare de colonii;
ARNm - Acid ribonucleic ribosomal;
SF – Standard de Firmă;
IT – Instrucțiune Tehnologică;
Ø – diametru, (mm);
GRAS – General recunoscut ca sigur;
NAD/NADH – Nicotinamid adenin dinucleotidă;
ATP – Adenozin trifosfat;
ADP – Adenozin difosfat;
ATCC – Colecția americană de cultură tip;
MPa – Megapascal;
SM SR EN ISO – Standard internațional adoptat la nivel național;

INTRODUCERE

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, acizi caprinici și linoleici, micro- și macroelemente ușor asimilabile și conține cu mult mai puțin colesterol [168].

În Republica Moldova se observă tendința de creștere a șeptelui de capre și sporirea volumului de lapte obținut [1]. Prin urmare, producția caprinelor reprezintă un important potențial alimentar, iar valorificarea lui la nivel industrial cu obținerea produselor lactate fermentate este relevant și avantajos.

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 [147,148].

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 izolarea și valorificarea tulpinilor autohtone de bacterii lactice cu proprietăți probiotice, competitive și relevante pentru industria alimentară în perspectiva utilizării lor industriale în producția de alimente funcționale [69]. 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 studiarea diversității speciilor izolate și a posibilității utilizării lor în industria laptelui [59].

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 [149]. 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 [129, 167].

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 elaborarea culturilor starter destinate fabricării produselor lactate fermentate 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 tehnologic 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 adecvate 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.

Sumarul compartimentelor tezei

Capitolul 1 „LAPTELE DE CAPRĂ SI BACTERIILE LACTICE UTILIZATE LA FABRICAREA BRÂNZETURILOR” include analiza realizărilor științifice în domeniul studiului laptelui de capră și valorificării practice a bacteriilor lactice, în special a tulpinilor izolate din lapte de capră.

Conform rezultatelor multiplelor studii realizate, laptele de capră, prin elementele pe care le conține, reprezintă un aliment complet, cu multiple avantaje față de laptele de vacă. Este recomandat în calitate de aliment funcțional datorită faptului că conține aproape toate substanțele necesare organismului uman într-o formă ușor asimilabilă. De rând cu aceasta, laptele de capră constituie și o sursă bogată de izolare a bacteriilor lactice cu proprietăți tehnologice valoroase, acreditate cu merite deosebite în ceea ce privește proprietățile nutriționale și terapeutice ale produselor lactate fermentate. Au fost raportate numeroase rezultate cu referire la rolul bacteriilor lactice în ameliorarea digestiei și biodisponibilității componentelor produselor lactate, inhibarea microflorei patogene a tractului digestiv, stimularea răspunsului imun la rotavirus, supresia cancerului, atenuarea intoleranței la lactoză și efectul anticolesterolic.

Progrese semnificative au fost înregistrate în elucidarea căilor metabolice de transformare a substratului de către principalele grupuri de bacterii lactice, ce se deosebesc între ele prin necesitățile nutriționale, proprietățile tehnologice, metabolice și de cultivare. Cunoașterea acestor particularități de transformare a unui aliment în alte produse pe cale homofermentativă sau heterofermentativă este de o mare importanță în procesul de asociere a tulpinilor de bacterii lactice în culturi starter destinate fabricării produselor lactate.

Analiza cercetărilor consacrate utilizării bacteriilor lactice în componența culturilor starter pune în evidență importanța elaborării asociațiilor noi din diferite tipuri de microorganisme autohtone și implementarea lor în tehnologia fabricării brânzei din lapte de capră prin metoda tradițională.

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 tulpini autohtone de bacterii lactice *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. lactis* biovar *diacetylactis*, *S. thermophilus*, care au fost izolate din habitatul lor natural – laptele crud de capră din diferite regiuni ale Republicii Moldova, precum și tulpinile tip de referință *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) și

Staphylococcus aureus (ATCC® 25923™), oferite de către laboratorul specializat al Agenției Naționale pentru Sănătate Publică al MSMPS al Republicii Moldova.

Cercetările științifice au fost efectuate în laboratorul Biotehnologii alimentare din cadrul Direcției „Tehnologii Alimentare” a IP Institutului Științifico-practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare (Republica Moldova).

Pentru realizarea lucrării au fost utilizate metode clasice și moderne de izolare, purificare și identificare fenotipică a bacteriilor lactice mezofile și termofile: *studiul morfologic* macroscopic și microscopic; *studiul fiziologic* pentru identificarea creșterii pe diferite tipuri de medii, la diferite temperaturi, concentrații de săruri și valori de pH, termorezistența, rezistența la bilă, fagotiparea; *studiul biochimic* de identificare a tipului de fermentație a carbohidraților, eliminarea de CO₂, identificarea catalazei, descompunerea esculinei, producerea catalazei, acetoiniei, a compușilor aromatici etc. Studiarea proprietăților morfologice ale bacteriilor lactice a fost realizată la microscopul binocular OPTEH cu putere de mărire 100x; vizualizarea coloniilor a fost efectuată cu ajutorul microscopului stereoscopic MBC-6 cu putere de mărire 6x. Pentru identificarea proprietăților antagoniste ale tulpinilor de bacterii lactice izolate a fost aplicată metoda godeurilor.

Caracterizarea tehnologică a tulpinilor izolate și a culturilor starter obținute prin asocierea lor a fost realizată prin aplicarea metodelor standard de identificare a puterii de acidifiere, de producere a acidului lactic și compușilor aromatici, a capacității de coagulare a laptelui și de sinereză. Conținutul de lactoză în laptele de capră a fost determinat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță. Cercetările consacrate determinării indicilor de calitate a culturii starter și a brânzei au fost efectuate conform metodelor descrise în documentele normative în vigoare (GOST, SM, ISO). Pentru păstrarea culturii starter elaborate a fost utilizată metoda liofilizării, iar optimizarea mediului de liofilizare a fost realizată prin planificarea matematică a experimentului.

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

Capitolul 3 „SELECTAREA TULPINILOR AUTOHTONE DE BACTERII LACTICE DIN LAPTE DE CAPRĂ” reflectă rezultatele cercetărilor efectuate privind izolarea, identificarea și selectarea tulpinilor autohtone noi de bacterii lactice; descrierea

proprietăților culturale, morfologice, fiziologice, biochimice și tehnologice ale tulpinilor autohtone izolate; determinarea parametrilor biotehnologici optimi pentru culturile selectate; modificarea mediului nutritiv și optimizarea mediului de protecție pentru liofilizarea tulpinilor de bacterii lactice autohtone.

Pentru izolarea culturilor pure au fost utilizate probe de lapte crud de capră din diferite regiuni ale Republicii Moldova. În total au fost prelevate circa 150 probe de lapte crud de capră din diferite regiuni ale Republicii Moldova, din care au fost obținute 7 izolate cu proprietăți caracteristice pentru *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. lactis* biovar *diacetylactis*, *S. thermophilus*.

Studiul proprietăților culturale, morfologice și fiziologo-biochimice ale culturilor a demonstrat că bacteriile selectate posedă însușiri caracteristice tulpinilor de: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*; *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*; *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* și *Streptococcus thermophilus* (forma și amplasarea celulelor, capacitatea de fermentare a carbohidraților și eliminarea CO₂, determinarea creșterii în lapte turnesolat, în mediu alcalin, formarea amoniacului din arginină, rezistența la temperaturi înalte, rezistente la bilă și albastru metilen, activitate de acidogeneză, producerea compușilor aromatici).

În urma cercetărilor proprietăților tehnologice ale tulpinilor de bacterii lactice izolate au fost evidențiate 5 tulpini stabile, pentru care au fost stabiliți parametri biotehnologici optimi ce asigură păstrarea proprietăților valoroase pentru obținerea produselor lactate de calitate sigură.

O influență stimulatorie asupra viabilității culturilor selectate a fost demonstrată la utilizarea laptelui de capră în calitate de mediu de cultură. Prin aplicarea metodei matematice de planificare a experiențelor, a fost determinată componența optimă a mediului protector pentru liofilizarea culturilor de bacterii lactice selectate, care contribuie la păstrarea viabilității și proprietăților biotehnologice ale lor.

Capitolul 4 „ELABORAREA TEHNOLOGIEI DE FABRICARE A BRÂNZEI CU APLICAREA CULTURII STARTER AUTOHTONE DE BACTERII LACTICE” este consacrat elaborării culturii starter mixte prin asocierea tulpinilor selectate de bacterii lactice și utilizării ei la fabricarea loturilor experimentale de brânză din lapte de capră. În acest scop, au fost parcurse următoarele etape: asocierea tulpinilor de bacterii lactice autohtone în culturi starter pentru fabricarea brânzei din lapte de capră; aprecierea calității laptelui de capră - materie primă; utilizarea culturii starter elaborate în procesul tehnologic de fabricare a brânzei; determinarea caracteristicilor de calitate și termenului de valabilitate ale produsului; realizarea studiului de

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

Pentru a valorifica potențialul biotehnologic al tulpinilor selectate, ele au fost incluse în asociații simbiotice cu scopul obținerii culturii starter destinate fabricării brânzei. Asociația obținută de bacterii lactice s-a dovedit a fi mai activă comparativ cu rezultatele obținute la fermentarea laptelui cu aplicarea culturii starter de import. Cercetările date au permis implementarea culturii starter autohtone cu potențial înalt de coagulare la fabricarea brânzei tradiționale din lapte de capră (BriCheese).

Studiile efectuate în scopul asigurării calității laptelui de capră, utilizat ca materie primă la obținerea produselor lactate, au permis elaborarea cerințelor privind laptele de capră destinat procesării pentru obținerea brânzeturilor, care au fost implementate în elaborarea Standardului Moldovenesc „Brânză din lapte de capră și de oaie. Specificații”.

În condiții industriale, la SRL „Major-Auto” din or. Taraclia, a fost fabricat un lot de brânză din lapte de capră, folosind cultura starter elaborată. Cercetările au stabilit, că utilizarea culturii starter multiple contribuie la mărirea termenului de păstrare a brânzei *fără a compromite* siguranța consumului produsului finit.

Rezultatele cercetărilor au contribuit la elaborarea tehnologiei de fabricare a brânzei din lapte de capră conform Standardului de Firmă „Brânză în saramură din lapte de capră și de oaie. Condiții tehnice” SF 40388050-001:2017 și Instrucțiunii Tehnologice IT MD 67-40388050-001:2017.

Efectul economic rezultat din implementarea în circuitul economic al tehnologiei elaborate se exprimă prin costul de 5 ori mai mic al unui flacon de cultură starter autohtonă, în comparație cu costul culturilor starter provenite din import, și costul de 1,3 ori mai mic al brânzei fabricate.

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 179 surse citate în teză.

Compartimentul „**ANEXE**” conține: Adeverințele de depozitare a tulpinilor autohtone noi de bacterii lactice; Certificatul de testare industrială a tulpinilor în cadrul SRL „Major-Auto”

(or. Taraclia, Republica Moldova) din 23.03.2017; Procesul verbal de producere a culturii starter; Actele de implementare a tehnologiei pentru fabricare laptelui de vacă și laptelui de capră de consum pasteurizat, eliberat de SRL „Prietenia-Agro” (or.Soroca, Republica Moldova) la 15.03. 2017, a culturii starter în cadrul SRL „Major-Auto” (or. Taraclia, Republica Moldova) din 30.06.2017 și a tehnologiei pentru fabricarea brânzei din lapte de capră și de oaie eliberat de SRL„Major-Auto”(or.Taraclia, Republica Moldova) la 31.05.2017; copiile foilor de titlu la Standardul de Firmă SF 40388050-001:2017 și la Instrucțiunea Tehnologică IT MD 67-40388050-001:2017 pentru fabricarea brânzei în saramură din lapte de capră și de oaie; Copii ale cererii de brevet, titlului de brevet și a diplomelor de însoțire a medaliilor obținute la saloanele internaționale de inovații; extras din Procesul verbal de degustare a sortimentului de brânzeturi din lapte de capră cu conținut de cultura starter din tulpini autohtone.

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

Laptele de capră și produsele lactate joacă un rol important în alimentația populației, datorită calităților nutritive excelente și valorii biologice sporite cu grad înalt de asimilare.

Avantajul caprinelor consta în faptul, că dieta lor include un număr important de plante medicinale, proteinele laptelui sunt de calitate superioară, iar produsele din lapte de capră (brânză, chefir, iaurt) fac parte din numărul celor mai echilibrate alimente cunoscute de om, manifestând și efecte terapeutice.

Importanța laptelui de capră în calitatea sa de materie primă valoroasă pentru producția industrială de produse lactate este bine studiată, dar diversitatea compoziției microbiologice a acestui produs valoros îl face relevant pentru cercetarea științifică în continuare.

Laptele prezintă o sursă naturală de obținere a tulpinilor de bacterii lactice cu proprietăți biotehnologice importante pentru industria alimentară, ceea ce determină necesitatea selectării acestor tulpini din lapte de capră, studierii și valorificării lor industriale [98, 99].

Izolarea, identificarea și caracterizarea bacteriilor lactice rămâne un subiect actual pentru microbiologie și biotehnologie, atât în aspect teoretic, cât și aplicativ.

Elaborarea și punerea în aplicare a unei strategii de dezvoltare a producției din lapte de capră ar permite îmbunătățirea bazei de materie primă a întreprinderilor pentru fabricarea produselor lactate autohtone de calitate superioară pentru alimentarea specializată a populației.

1.1 Caracteristicile laptelui de capră în calitate de aliment și sursă naturală de izolare a bacteriilor lactice

Laptele de capră și produsele lactate obținute din el joacă un rol important în alimentația populației, mai ales a țărilor în curs de dezvoltare. În țările economic dezvoltate creșterea caprinelor prezintă interes în contextul tendinței de consum a produselor alimentare sănătoase. Numeroase statistici includ consumul de lapte de capră pe cap de locuitor ca pe un indicator de bunăstare și prosperitate. Ramura agricolă începe să aprecieze avantajele acestor animale, creșterea și reproducerea cărora nu necesită cheltuieli mari pentru echipamente și instalații. Astăzi putem vorbi despre o renaștere a ramurii de creștere a caprinelor, ca bază de materie primă pentru obținerea produselor lactate cu proprietăți curativ-dietetice și valoare nutritivă înaltă [46].

Producerea laptelui de capră este bine dezvoltată în Europa (Franța, Spania, Olanda, Norvegia). În majoritatea țărilor laptele de capră este procesat la ferme sau la întreprinderi mici.

Conform datelor FAO, în anul 2000 numărul total de caprine în lume a atins cifra de aproximativ 720 milioane. Între anii 1991 și 2016 populația caprinelor a crescut cu 55%, dar obținerea produselor din lapte de capră - cu 70% [86]. Cel mai mare număr de caprine din lume este atestat în zonele uscate, calde, semi-aride și deșertice, pe pășuni cu vegetație foarte rară și în zonele cele mai inaccesibile.

Printre țările crescătoare de caprine, pe primul loc se situează India și China, după care urmează în ordine descrescândă: Pakistanul, Nigeria, Somalia, Sudanul, Brazilia, Indonezia, Mexicul, etc. Capricultura este bine dezvoltată și în unele țări din Europa (Franța, Elveția, Austria, Anglia, Portugalia etc.), datorită unor rase cu productivitate înaltă: Alpină franceză, Saanen-ul elvețian, Nobilă germană etc. [34].

Există peste 200 de rase de capre. Toate rasele moderne de capre pentru lapte au apărut în Europa, de unde s-au răspândit în întreaga lume. Europa, în special partea alpină din Elveția, Franța, Italia și Slovenia, este considerată leagănul raselor de capre pentru lapte.

În Republica Moldova, de rând cu caprinele de populație locală, sunt înregistrate șapte alte rase: Saanen, Togghenburg, Alpină Franceză, Anglonubiană, Boer, Murciano, Angora [21].

Potrivit Biroului Național de Statistică, în Republica Moldova se observă dinamica creșterii efectivului (numărul total de caprine) de la 100 mii capete în anul 2000 până la 159,2 mii capete în 2017. Cu toate acestea, cantitatea de produse obținute de la caprine în acești ani a scăzut de la 7 mii tone până la 4,2 mii tone din cauză lipsei unui program concret de creștere și ameliorare a caprinelor.

Industria de prelucrare a laptelui în Republica Moldova este reprezentată de 33 întreprinderi, din care numai câteva mini-întreprinderi se ocupă cu procesarea laptelui de capră [1]. Produsele din lapte de capră se obțin în condițiile gospodăriilor individuale, deseori fără suport tehnico-normativ, ceea ce împiedică comercializarea lor legală pe piață [12, 17, 34].

Laptele crud destinat procesării pentru fabricarea brânzei, trebuie să reprezinte un mediu favorabil pentru dezvoltarea bacteriilor lactice și să corespundă indicilor de calitate nutritivă și igienică [26]. De aceea, în laboratorul Biotehnologii alimentare al Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare (IȘPHTA), a fost elaborat proiectul Standardului Național SM 317: 2015 “Lapte crud de capră și oaie. Specificații” care se referă la laptele crud de oaie și capră, destinat procesării industriale pentru fabricarea diferitor sortimente de produse lactate.

Conform proprietăților organoleptice laptele de capră destinat obținerii brânzei trebuie să prezinte un lichid omogen, fără sediment și flocule, să aibă gust și miros specifice, fără gust și miros străin. Apariția mirosului și gustului străin în lapte este, de cele mai multe ori, rezultatul activității biochimice a diferitor microorganisme, provenite de la animale bolnave sau din mediul înconjurător; în acest caz laptele este impropriu consumului.

Conform proprietăților chimice, laptele reprezintă o emulsie de grăsimi într-o soluție apoasă, care conține numeroase alte substanțe sub formă coloidală sau în stare dizolvată (lactoză, săruri minerale, vitamine, etc.). El constituie un aliment foarte valoros pentru hrana omului prin conținutul său bogat și variat în substanțe nutritive, mai ales proteine (Figura 1.1).



Fig. 1.1. Principalii constituenți chimici ai laptelui [3]

Compoziția fizico-chimică a laptelui de capră este condiționată de rasă, individualitate, zonă și vârstă, nivelul și natura alimentației, faza de lactație, frecvența și durata mulsului, starea de sănătate a animalului [34].

Cele mai importante proprietăți fizico-chimice ale laptelui de capră sunt: fracția masică de substanță uscată degresată (SUD), aciditatea, densitatea, conținutul de grăsimi, proteine, lactoză.

Densitatea sa este influențată de conținutul de substanță uscată cât și de raportul care există dintre substanța uscată grasă și grasă. Densitatea laptelui de capră este cuprinsă între 1,027 și 1,034°A. Densitatea crește odată cu creșterea conținutului de substanță grasă și scade proporțional cu creșterea conținutului de grăsime. Cunoașterea densității prezintă importanță, atât pentru depistarea eventualelor falsificări prin diluarea laptelui, cât și pentru a stabili conținutul de substanță uscată.

Se consideră, că principalele componente ale laptelui sunt proteinele, grăsimile și lactoza. Conținutul de grăsimi și proteine în laptele de capră depinde de mulți factori, inclusiv perioada anului. În zonele cu climă temperată, la sfârșitul verii, în laptele de capră se înregistrează cel mai

scăzut nivel de grăsimi și proteine, și cei mai înalți indicatori ai acidității active. Conținutul de grăsimi și proteine este influențat și de perioadele de lactație. La reducerea numărului de mulsuri au loc schimbări ale conținutului proteinelor, pe când conținutul de grăsimi rămâne neschimbat. La sfârșitul perioadei de lactație, odată cu reducerea volumului de lapte muls, în lapte se mărește cantitatea de proteină și lactoză. Cu toate acestea fracțiile masice ale proteinelor, grăsimilor și lactozei sunt mici comparativ cu conținutul apei în produsele lactate, de exemplu brânza conține 37-60% apă, iar produsele lactate uscate doar 3-5% apă. Rolul apei în formarea structurii produselor lactate este deja cunoscut, dar semnificația sa funcțională nu este încă dezvăluită în totalitate. Cu toate acestea, prelucrarea laptelui este strâns legată de proprietățile unice și caracteristicile structurale ale apei [157].

Analiza rezultatelor studiilor comparative privind compoziția fizico-chimică a laptelui de vacă și laptelui de capră a evidențiat deosebiri în ce privește parametrii fizico-chimici (fracțiunea de masă a grăsimilor, proteinei, lactozei, densitate, aciditate), ceea ce relevă proprietăți tehnologice diferite și multe avantaje ale laptelui de capră față de laptele de vacă [23, 168].

Laptele de capră este considerat superior laptelui de vacă datorită efectelor nutritive, tonifiante, antirahitice, antianemice și antiinfecțioase. De asemenea, trebuie remarcat faptul că laptele de capră are proprietăți antialergice. Lactoza laptelui de capră are cristale mai mici, ce condiționează o fermentare mai intensivă și mai complexă, diminuând riscul de reacții alergice, care ar putea fi provocate de laptele de vacă.

Proteinele laptelui de capră comparativ cele ale laptelui de vacă sunt mai ușor asimilabile și mai bogate în astfel de aminoacizi ca histidina, lizina, acidul aspartic, tirozina, triptofanul; conține mai multe proteine serice, mai cu seamă globuline imune; are conținut mărit de lactalbumină și lactoglobulină și cel mai important – imunoglobulină.

Laptele de capră conține mai mult azot deproteinizat, proteinele sunt de calitate mai bună, cu un conținut mai înalt de tiamină decât orice alt produs alimentar, și practic nu produce reacții alergice și tulburări digestive. Este cunoscut faptul că α_{s1} -cazeina – proteina principală a laptelui de vacă – este un alergen puternic pentru oameni [128].

Datorită fineții globulelor de grăsime, laptele de capră este ușor absorbit de vilozitățile intestinale, și deci, are o digestibilitate mai înaltă. Sub acțiunea sucului gastric, proteinele coagulează în flocoane fine, sunt ușor digerate de enzimele proteolitice ale intestinului subțire și, prin urmare, sunt ușor asimilate.

Laptele de capră este mai bogat în calciu, fosfor, fier, potasiu și magneziu, acid citric, acizi caprinic și linoleic, având un conținut ridicat de vitamina C, B1, B2, A. Conține cu mult

mai puțină colesterolină și posedă proprietăți antioxidante mai înalte, ceea ce este benefic pentru organismul uman.

Prin aceste elemente, laptele de capră reprezintă un produs valoros cu proprietăți dietetico-curative pronunțate, recomandat în alimentația copiilor, bolnavilor, bătrânilor [96] .

S-a demonstrat că fracția masică de grăsimi și proteine a laptelui de capră în toate anotimpurile anului, cu excepția sezonului de vară, a depășit același indicator în laptele de vacă cu 0,41%, 0,65%, 1,0% și cu 0,16%, 0,14% și 0,2% respectiv [169].

În perioadele de vară, toamnă și iarnă, fracția masică a lactozei în lapte de capră, în comparație cu cel de vacă, a fost mai mare, respectiv, cu 0,1% și 0,46%. În cazuri când laptele de capră posedă fracția masică de lactoză mai mare, comparativ cu laptele de vacă, moleculele acesteia sunt mai mici și de aceea sunt mai intens atacate de enzima-lactază (β -galactozidaza), produsă de microflora culturii starter. Aceasta prezintă o oportunitate a utilizării laptelui de capră pentru alimentația dietetică și cea pentru copii [72, 81].

Fracția masică de substanțe uscate din lapte de capră, în perioadele de primăvară, toamnă și de iarnă, comparativ cu laptele de vacă, a fost mai mare, respectiv cu 1,43- 1,40 și 1,8% . Cea mai sporită valoare a fracției masice de substanță uscată degresată (SUD) apare în sezonul de primăvară: în lapte de capră - 9,7%, respectiv 8,68 % în laptele de vacă. Prin urmare, laptele de capră este mai avantajos pentru procesarea tehnologică, decât cel de vacă.

Laptele reprezintă un mediu de cultură complet și favorabil pentru numeroase microorganisme specifice sau un mediu convenabil de supraviețuire pentru alte microorganisme și virusuri care îl pot polua.

Principala sursă de contaminare a laptelui este mediul extern - microorganismele ajung în lapte din atmosferă datorită lipsei igienei adăposturilor, animalului și obiectelor folosite la muls, modului de manipulare, răcire și transportare al laptelui, a apei care nu corespunde cerințelor sanitar-veterinare.

Caprinele prezintă un risc sanitar-epidemiologic mult mai scăzut, deoarece nu suferă de bruceloză, tuberculoză și alte boli care afectează bovinele, de aceea laptele de capră poate fi consumat în stare crudă, păstrându-și în acest fel eficacitatea maximă a proteinelor, lipidelor, glucidelor, vitaminelor, enzimelor și sărurilor minerale [98].

Indicatorii microbiologici ai laptelui crud au o importanță deosebită, când este vorba de consum de produse lactate și sănătate. Trebuie de menționat că enzimele secretate de microorganismele ce se dezvoltă în lapte, catalizează sau inhibă reacțiile biochimice, care cu certitudine pot avea efecte atât pozitive, cât și negative asupra indicilor de calitate ai laptelui.

Apariția defectelor produselor lactate este determinată de activitatea microorganismelor, de aceea trebuie să fie examinată microflora laptelui în calitate de materie primă [129].

Din punct de vedere al siguranței alimentare, există cercetări, care demonstrează că laptele de capră și produsele din lapte de capră conțin cu mult mai puține bacterii patogene decât laptele altor animale.

Rezultatele cercetărilor privind gradul de contaminare bacteriană a laptelui de capră și a laptelui de vacă, în funcție de sezonul anului, au demonstrat că laptele de vacă conține mai multă microfloră contaminantă, comparativ cu cel de capră. În special, *numărul de microorganisme mezofile aerobe și facultativ anaerobe (NMMAFA)* în lapte de vacă în calitate de materie primă a fost de 100 ori mai mare decât în laptele de capră, dar numărul de bacterii coliforme în laptele de vacă - de 10 ori mai mare decât în lapte de capră. Nivelul de contaminare a laptelui de vacă a fost practic independent de sezon, în timp ce laptele de capră recepționat în sezonul estival a fost mai contaminat decât primăvara, toamna sau iarna și conținea NMMAFA $1,2 \times 10^4$ UFC / cm³ și bacterii coliforme, respectiv 3×10^2 UFC/ cm³ [168].

Sunt cunoscute rezultatele studiilor indicilor de calitate și siguranță a brânzeturilor fabricate din lapte crud de capră. În aceste brânzeturi nu au fost depistate bacterii patogene din genurile *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, comparativ cu brânzeturile obținute din laptele altor animale [62, 75].

Analiza datelor arată că laptele de capră ca substrat nutritiv pentru bacteriile lactice, diferă de laptele de vacă după raportul componentelor, valoarea biologică, unele caracteristici structurale și indicii fizico-chimici, aciditate mai înaltă, conținut mai înalt de substanțe uscate totale și degresate (de lactoză, vitamine, aminoacizi și a.). Toate acestea predetermină diversitatea compoziției speciilor de bacterii lactice izolate din lapte de capră, utile pentru industria laptelui deoarece posedă proprietăți biotehnologice importante, fapt ce constituie încă un avantaj semnificativ [16].

Sunt cunoscute și alte surse naturale de izolare a bacteriilor lactice: sol, plante, hidrobionți, precum și produse finite - pâine, bere, salamuri etc. [172].

Spre exemplu, au fost izolate șase bacterii lactice probiotice din produsul tradițional fermentat de caise Chulica. Acestea sunt rezistente la un pH scăzut, sunt capabile de a produce acid lactic și bacteriocine eficiente împotriva microorganismelor patogene: *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas syringae* [67].

Cercetătorii ruși au izolat 55 tulpini de bacterii lactice mezofile din laptele de vacă crud din diferite zone teritoriale ale Rusiei. Este de remarcat faptul că cele mai active 3 tulpini au fost

identificate ca *Lactococcus lactis subsp. lactis* și posedă un spectru mult mai larg de activitate asupra microorganismelor patogene [173].

În țările în curs de dezvoltare (Asia, Africa, Orientul Mijlociu și unele țări mediteraneene), s-a realizat studiul compoziției speciilor, proprietăților și potențialului biotehnologic al tulpinilor de bacterii lactice comercial valoroase izolate din habitatul lor natural - laptele de capră. Conform rezultatelor obținute, aceste bacterii lactice posedă activitate coagulantă sporită, capacitatea de creștere în mediu cu pH 4,2 și se caracterizează printr-o activitate proteolitică înaltă [59].

A fost studiată microflora produselor lactate din lapte de capră de la diferite rase și a fost evidențiată diversitatea microflorei spontane de bacterii lactice izolate din lapte de capră din regiunile aride și relativ aride din Marocco, Kazahstan, Mongolia, India, Indonesia, Algeria, etc. [58, 66, 99, 148].

În laptele crud de capră au fost identificate tulpini de bacterii lactice din genurile *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*. Au fost izolate, studiate și identificate tulpini de *S. thermophilus*, *L. lactis subsp. lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. helveticus*. Într-un alt studiu au fost identificate și tulpini de *L. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*. [58, 66, 99].

Studii ample au fost realizate de către cercetătorii Nomura, M. et al. (2006), Maysoon, S. et al. (1995) și Radulovici, Z. et al. (2011), care au prelevat și au studiat probe de lapte de vacă, capră și produse lactate (brânză, iaurt, smântână) din China, Marocco, Serbia, Ucraina, precum și 12 probe de la fermele din Statele Unite ale Americii. În rezultat au fost izolate și identificate culturi pure de bacterii lactice – *L. lactis ssp. diacetylactis*, *L. lactis ssp. cremoris*, *L. lactis ssp. lactis*, care se caracterizează cu proprietăți biotehnologice valoroase, utile pentru aplicarea industrială la obținerea unor produse de calitate înaltă standardizate [89, 91, 98].

Kornabaeva, Z. (2014) comunică despre cercetările privind izolarea din lapte crud de capră și din produsul național „curd” din lapte de capră din Sudul Kazahstanului, a 25 tulpini de bacterii lactice mezofile, care le consideră mai adaptate la condițiile climaterice locale și materia primă autohtonă. Tulpinile se caracterizează prin acidogeneză și activitate antimicrobiană sporită, și rezistență la antibiotice [148].

Bacteriile lactice izolate din lapte crud de capră prezintă un potențial tehnologic sporit. Astfel, din produsele lactate de capră, din nord-vestul Argentinei au fost izolate și caracterizate 286 tulpini de bacterii lactice, din care au fost selectate opt tulpini cu proprietăți tehnologice și

activitate enzimatică propice utilizării în calitate de culturi starter pentru fabricarea brânzeturilor din lapte artizanal de capră [110].

Din o sută douăzeci de tulpini de bacterii lactice, izolate din lapte crud de capră în vestul Algeriei și testate pentru activitatea proteolitică, antibacteriană și de acidogeneză, tulpina *L. lactis subsp. lactis* LC2 a prezentat cea mai sporită activitate de acidulare, în timp ce la șapte tulpini de *Lactococcus* și șase tulpini de *Lactobacillus* a fost detectată activitatea antimicrobiană. Unele tulpini au demonstrat simultan o activitate sporită în ce privește 2 sau 3 parametri tehnologici [58].

Badis, A. et al. (2004) a studiat 725 tulpini de bacterii lactice izolate din lapte crud de capră a patru rase algeriene și a observat următoarele proprietăți tehnologice: 38,6% dintre izolați au prezentat acidogeneză rapidă (mai mult de 60°D timp de 18 ore de incubare); 25,9% dintre izolați au avut o capacitate proteolitică sporită (mai mult de 6ppm leucină / 72 ore) și 14,1% dintre izolați au avut o producție înaltă de diacetil (mai mult de 0.8ppm diacetil / 16 ore) [38].

Tulpini de bacterii lactice cu potențial probiotic au fost evidențiate în cercetările efectuate de W.L.G. de Almeida Junior et al. (2015). Tulpinile izolate din lapte crud de capră au manifestat proprietăți antimicrobiene față de *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *Shigella flexneri* și *E. coli*. și au demonstrat siguranța microbiologică a produsului, fiind inoculate pentru obținerea brânzei artizanale [114].

În decursul anilor 2015-2018 în Republica Moldova s-au efectuat studii de izolare din lapte crud de capră a tulpinilor autohtone de bacterii lactice [44, 101, 125].

Tulpinile izolate, ce aparțin bacteriilor lactice mezofile și termofile cu activitate coagulantă sporită, sunt de perspectivă pentru utilizarea în componența culturilor starter pentru obținerea diferitor produse lactate fermentate tradiționale din lapte de capră [101, 125]. S-a confirmat faptul că în probele de lapte crud predomină tulpinile de bacterii lactice *L. lactis subsp. lactis* față de *L. lactis subsp. cremoris* [44].

Reieșind din proprietățile menționate ale laptelui de capră, este tot mai evidentă necesitatea cercetărilor asupra acestui produs în calitate de sursă de izolare a culturilor pure de bacterii lactice, iar pentru Republica Moldova este imperativă necesitatea unor astfel de cercetări ce ar permite selectarea tulpinilor autohtone cu proprietăți biotehnologice importante și valorificarea lor în componența culturilor starter destinate fabricării produselor din lapte de capră [8, 47, 52, 101].

1.2 Bacteriile lactice și căile lor metabolice de transformare a substratului

Bacteriile lactice prezintă o grupă specifică de microorganisme, care condiționează fermentarea acidolactică – descompunerea glucidelor până la acid lactic. Fermentarea glucidelor poate fi realizată pe cale homofermentativă cu producerea exclusivă a acidului lactic, și pe cale heterofermentativă, în condițiile în care pe lângă produsul de bază – acidul lactic, se formează și produse secundare - acidul acetic, bioxidul de carbon, substanțe aromatice, alcoolul etilic etc.

Primele cercetări științifice ale acestor organisme au fost efectuate de către L. Pasteur, rezultatele cărora au fost publicate în 1857. De atunci bacteriile lactice prezintă un obiect de atenție deosebită din partea specialiștilor în domeniu.

Bacteriile lactice cuprind o largă varietate de genuri, incluzând un număr considerabil de specii. În componența culturilor starter pentru obținerea produselor lactate fermentate sunt incluse atât bacterii lactice în formă de bacili, reprezentate prin genul *Lactobacillus*, cât și în formă de coci reprezentate de genurile *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* și *Leuconostoc* [2].

Genul *Lactobacillus* reprezintă un grup de bacterii lactice gram-pozitive, cu specii homo- sau heterofermentative în ceea ce privește metabolismul hexozelor, catalază-negative, cu unele tulpini ce descompun peroxidul.

Bacteriile din familia *Streptococcaceae* fac parte din grupa cocilor gram pozitivi și cuprinde trei genuri *Leuconostoc*, *Lactococcus* și *Streptococcus* [159].

În produsele lactate, bacteriile lactice din genul *Leuconostoc* au două funcții de bază: produc compuși de aromă (diacetil, acetoină) și produc ochiuri de fermentare în unele tipuri de brânzeturi (Edam, Gouda, Tilsit). Dar aceste bacterii au capacitatea scăzută de formare a acidului lactic, necesită adaos de stimulatori pentru coagulare și nu manifestă activitate proteolitică – parametru esențial în procesul de selectare a bacteriilor lactice [172, 119].

Reprezentanții genului *Lactococcus* sunt bacterii lactice Gram-pozitive, în formă coci sau forme derivate ale acestora, prezentând uneori celule ovoidale, în funcție de condițiile de cultivare. Celulele, care de obicei sunt asociate în perechi sau lanțuri scurte, au diametrul de 0,5 – 1,5 μm și nu prezintă mobilitate.

Caracterizați prin auxotrofie severă față de unii aminoacizi și vitamine, lactococii sunt facultativ anaerobi, au capacitatea de a se dezvolta în diapazonul de temperatură 10 – 45°C, cu un optim de 25 – 30°C. Aceste proprietăți sunt utile în diferențierea speciilor genului *Lactococcus* de cele ale genului *Streptococcus thermophilus* [12, 16].

Genul *Lactococcus* cuprinde 5 specii, din care reprezentantul tipic este *Lactococcus lactis*, ce cuprinde subspeciile: *Lactococcus lactis ssp. cremoris* și *Lactococcus lactis ssp. lactis* cu biovarianta producătoare de aromă *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* [2, 84, 172].

Dintre factorii de creștere ce influențează dezvoltarea și activitatea fiziologică a lactococilor, cei mai importanți sunt aminoacizii izoleucina, valina, leucina, histidina, metionina, arginina, prolina, acidul glutamic, serina și treonina; vitaminele biotina, piridoxalul, acidul folic, riboflavina, niacina, tiamina și acidul pantotenic. În plus, de rând cu glucoza, unele microelemente sunt esențiale pentru dezvoltarea optimă în medii definite.

Conform profesorului microbiolog Stepanenco, P. (1999) pentru dezvoltare lactococii necesită medii nutritive cu aminoacizi, hidrolizat proteic din carne, lactoalbumine, cazeină și vitamine, în special vitaminele grupei B. În calitate de sursă de carbon utilizează mono- și dizaharide și acizi organici [172].

Lactococii, ca și majoritatea bacteriilor lactice în general, sunt cultivați pe medii lichide cu lapte degresat sau lapte hidrolizat și pe medii nutritive agarizate cu lapte hidrolizat.

Pe suprafața mediului agarizat cu lapte hidrolizat și cretă formează colonii de tip S în formă de picături mici cu margine regulată, dimensiuni 0,5 – 1,0 mm cu zone transparente condiționate de transformarea carbonatului de calciu sub acțiunea acidului lactic în lactat de calciu solubil. În profunzime coloniile au formă lenticulară. Lactococii cresc în medii nutritive cu pH cuprins între 5,5 și 8,8 [172].

Proprietățile biochimice ale lactococilor pot fi identificate după intensitatea acidogenezei, aciditatea limită, capacitatea de a fermenta citrați, activitatea proteolitică și calitatea cheagului.

La *Lactococcus lactis ssp. lactis* celulele se amplasează în general în formă de diplococi, în lapte formează și lanțuri scurte, temperatura optimală de dezvoltare este 30 - 35°C, este un acidifiant activ; la temperatura optimă coagulează laptele în timp de 10 - 12 ore (o ansă de cultură în 10 ml lapte steril), formând coagul omogen, dens, atingând limita de aciditate la 120°T; reduce și coagulează laptele turnesolat, descompune arginina cu eliminarea amoniacului, nu se dezvoltă în mediu bazic cu pH 9,5, fermentează galactoza, glucoza, maltoza și lactoza, nu fermentează arabinoza, xiloza, zaharoza, tregaloza, salicina, inulina, glicerolul, sorbitolul. Unele tulpini produc antibioticul nizina, care inhibă dezvoltarea majorității stafilococilor, clostridiilor, micrococilor ș.a. [36, 119, 173].

La *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, spre deosebire de *Lactococcus lactis ssp. lactis*, celulele formează în lapte lanțuri de lungime diferită; temperatura optimă de dezvoltare este 20-

25°C; are activitate de acidogeneză mai slabă în comparație cu *Lactococcus lactis ssp.lactis*; la temperatura optimă procesul de coagulare durează 12 ore (o ansă de cultură în 10 ml lapte steril), formând coagul omogen, dens, cu consistență cremoasă, unele tulpini formând un coagul vâscos; dezvoltă o aciditate titrabilă în limită de 110 - 115°T, nu produce amoniac din arginină, nu crește în mediu cu pH 9,2 și în mediu cu conținut de 4% de NaCl; nu crește în lapte cu 0,3% albastru de metilen. Se întâlnește în natură cu mult mai rar decât *Lactococcus lactis ssp. lactis* [119, 172].

Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis se evidențiază prin calea metabolică heterofermentativă deoarece, în afară de acidul lactic din lactoză și acid acetic din glucoză, produce și substanțe aromatice diacetil și acetoină din citrați. Celulele acestei biovariante se amplasează asemănător *L. lactis ssp.lactis*; dar se deosebesc prin activitate acidifiantă mult mai slabă decât *Lactococcus lactis ssp.lactis* și *Lactococcus lactis ssp.cremoris*, formează coagul timp de 16 ore (o ansă de cultură în 10 ml lapte steril) și mai mult, aciditatea limită atinge 70 - 100°T, reduce și coagulează laptele turnesolat, crește în mediu cu 4% NaCl, majoritatea tulpinilor descompun arginina cu eliminarea amoniacului. Temperatura optimală de creștere este 25°C [2, 82, 173].

Figura 1.2 reprezintă căile metabolice de transformare a substratului la bacteriile lactice homofermentative și heterofermentative [115].

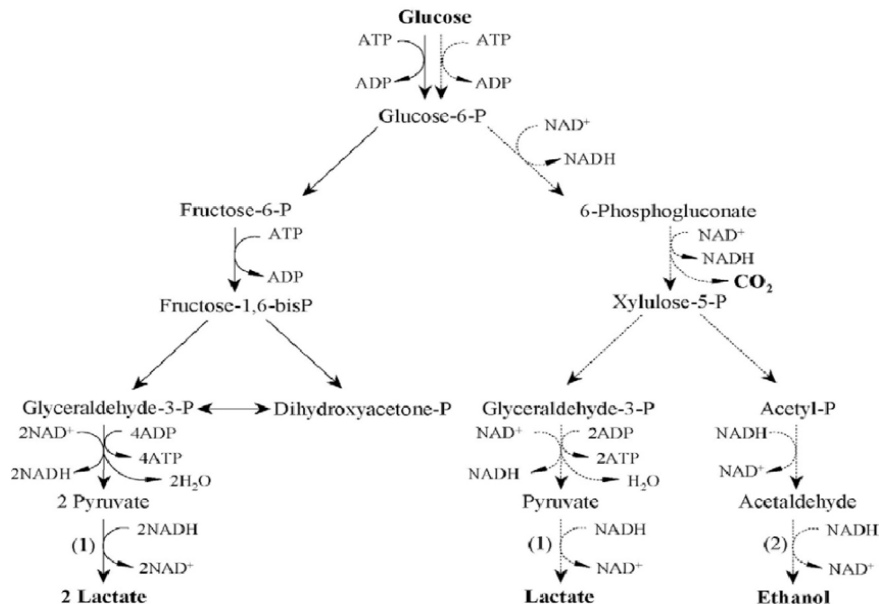


Fig. 1.2. Căile metabolice la bacteriile lactice homofermentative și heterofermentative [115]

Reprezentantul principal al genului *Streptococcus* este *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, care după anul 1985 a fost reclasificat în *Streptococcus thermophilus*. Sunt bacterii lactice Gram-pozitive, nesporogene, imobile, de forma sferică sau ovală, în frotiuri se întâlnesc în lanțuri.

Conform proprietăților culturale *S. thermophilus* este facultativ anaerob; se dezvoltă în limite largi de temperatură, se multiplică la 45°C, fiind o specie termofilă; se dezvoltă pe medii ce conțin peptonă, glucide (glucoză, sucroză), incubarea se realizează la 37°C, timp de 24 ore. Pe mediile solide formează colonii mici (cu diametrul de 0,5-1 mm), uniforme, cu margini regulate, lucioase, nepigmentate, semitransparente.

Activitatea proteolitică a streptococilor este în general mai slabă decât cea a lactobacililor, concluzie rezultată în urma determinării azotului neproteic în laptele degresat inoculat cu *Lactococcus lactis*. Intensitatea acidogenezei este mai mare în comparație cu alți streptococi lactici. Formează coagul timp de 3,5-6 ore, aciditatea limită prezintă 110 - 115°T.

Bacteriile speciei *S. thermophilus* nu produc catalaza și oxidaza, nu fermentează manitolul, maltoza, D-sorbitolul, inulina, glicerina, ramnoza, salicina, dextrina, rafinoza, xiloza și nici trehaloza. *S. thermophilus* nu se dezvoltă în medii cu albastru metilen, NaCl și pH 9,6, nu reduc laptele turnesolat la 30 °C.

S. thermophilus este utilizat la obținerea produselor lactate și ocupă locul II (după *Lactococcus lactis*) după importanță printre culturile starter utilizate în industria laptelui. Această specie bacteriană face parte din grupul bacteriilor lactice termofile și este utilizată împreună cu *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* în obținerea laptelui covăsit, iaurtului, băuturilor acido-lactate [173].

Cercetătorii Bannikova, L., Koroliova, N. (1975) de la Institutul de Cercetări Științifice din domeniul Laptelui din Rusia și Laudoni, A. (1995) de la Institutului de Chimie Alimentară din România au propus metode de identificare și diferențiere a subspeciilor de bacterii lactice utilizate în industria laptelui [19, 119].

Un rol deosebit îl au bacteriile la fabricarea produselor lactate fermentate (lapte acru, iaurturi, brânzeturi, etc.) [35, 172]. Pentru obținerea diferitor brânzeturi sunt folosite culturile starter compuse numai din bacterii mezofile (culturile starter singulare formate din *L.lactis subsp.lactis* și *L.lactis subsp.cremoris*) sau din bacterii mezofile și termofile (culturile starter mixte).

Activitatea vitală a microorganismelor lactice are un rol decisiv la fabricarea produselor lactate fermentate, asigurând desfășurarea proceselor biochimice în direcția dorită, obținându-se proprietățile specifice fiecărui produs. În scopul dirijării proceselor biochimice și obținerii produselor lactate cu proprietăți organoleptice superioare, în tehnologia laptelui se folosesc culturi pure de bacterii lactice special selecționate [106, 108].

1.3 Culturi starter de bacterii lactice utilizate la fabricarea brânzeturilor

Obținerea produselor lactate fermentate este imposibilă fără utilizarea culturilor de bacterii lactice, de proprietățile cărora în mare măsură depinde calitatea produsului finit.

Din cele mai vechi timpuri laptele fermentat de cultură spontană era folosit în calitate de maia pentru însămânțarea laptelui crud. Dar asemenea procedeele făceau posibilă și multiplicarea unor microorganisme nedorite, care determinau multiple defecte ale produselor sau puteau fi dăunătoare sănătății consumatorilor.

În scopul dirijării proceselor biochimice și obținerii produselor lactate de calitate superioară, în tehnologia laptelui se folosesc culturi pure de bacterii lactice special selecționate cu proprietăți biotehnologice stabile [3, 160].

Culturile starter sunt aplicate în obținerea produselor lactate din categoria „alimentelor funcționale”, bogate în componente nutritive valoroase: proteine, glucide, acizi organici, vitamine, minerale [20, 96, 123]. Sub aspectul importanței acestor alimente funcționale, în Republica Moldova a fost elaborată și implementată cultura starter din bacterii lactice autohtone, care a obținut diverse distincții la expozițiile internaționale de invenții (Anexa 1) [5, 20].

Prin folosirea culturilor selecționate pure în procesul de fabricare a produselor lactate acide se obține un efect dublu – tehnologic și igienic. Efectul tehnologic constă în faptul că prin concentrația optimă a microorganismelor specifice în lapte se obține aciditatea și aroma dorită pentru fiecare produs în parte. Efectul igienic se manifestă prin dominarea microflorei favorabile față de contaminanții rezistenți din lapte și de contaminanții apăruiți în procesul de fabricare a produsului [16, 50, 78].

În brânzeturi, bacteriile lactice inhibă dezvoltarea microorganismelor nedorite care pot da produsului finit diferite defecte de aromă, structură și aspect sau sunt dăunătoare sănătății omului. În plus, aciditatea grăbește acțiunea pepsinei și favorizează eliminarea zerului din coagul. Scăderea conținutului de apă mărește capacitatea de păstrare a brânzei. Microflora lactică are și o activitate proteolitică care scindează macromoleculele proteice și contribuie în acest fel la îmbunătățirea aromei și texturii produsului finit [3].

Deci, funcțiile principale ale culturilor starter la fermentarea laptelui sunt:

- coagularea laptelui și formarea texturii produsului lactat finit;
- producerea acidului lactic, substanțelor antibacteriene, substanțelor aromatice;
- favorizarea procesului de maturare a brânzeturilor prin activitatea lor enzimatică;
- obținerea produsului cu proprietăți funcționale [65].

Culturile starter sunt definite drept culturi ce se obțin din cultura pură stoc (inoculum) și

care prin trecere la culturi intermediare (pasaje) pot fi folosite la obținerea produselor lactate fermentate (produse lactate acide, smântână, brânzeturi etc). Culturile starter pot fi clasificate în mezofile și termofile [2].

Culturile starter mezofile singulare sunt formate numai din *L. lactis subsp. lactis* și *L. lactis subsp. cremoris*. Folosirea acestor culturi este dictată de necesitatea de a evita formarea „ochiurilor” de fermentare la unele brânzeturi, „ochiuri” formate în urma producerii de CO₂ de către bacteriile aromatizante.

Culturile starter mezofile multiple reprezintă amestecuri de 5-6 tulpini selecționate compatibile, cultivate separat până la stadiul de cultură primară. Tulpinile nu se dezvoltă împreună, ceea ce face ca nici o tulpină să nu devină dominantă. Aceste culturi pot fi folosite mai multe luni în șir fără a-și pierde capacitatea de acidifiere.

Culturile starter mezofile mixte sunt formate din specii de bacterii acidifiante din genul *Lactococcus*, și din specii de bacterii producătoare de aromă din genul *Lactococcus* sau *Leuconostoc* și se deosebesc prin următoarele tipuri:

Tipul L - formate din bacterii acidifiante (*L. lactis* sau *L. cremoris*) și bacterii producătoare de aromă numai din genul *Leuconostoc* (*Leucon. citrovorum*, *Leucon. dextranicum*, *Leucon. lactis*);

Tipul D - formate din bacterii acidifiante (*L. lactis* sau *L. cremoris*) și numai *L. lactis biov. diacetylactis* în calitate de bacterii producătoare de aromă;

Tipul LD - formate din bacterii acidifiante (*L. lactis* sau *L. cremoris*) și bacterii producătoare de aromă, atât din specii de *Leuconostoc*, cât și *L. lactis biov. diacetylactis* [16].

Culturile starter termofile pot fi de două tipuri:

Acidifiante – culturi formate numai din *Lactobacillus acidophilus*;

Acidifiante/aromatizante – culturi constituite din unul sau mai multe specii de lactobacili și dintr-o specie de streptococi. Se deosebesc: cultura starter termofilă pentru iaurt (*Lb. bulgaricus* și *Str. thermophilus*), și cultura starter termofilă pentru brânzeturi cu pastă tare și semitare (*Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis*, *Lb. helveticus* și *Str. thermophilus*).

Datorită aplicării culturilor termofile la brânzeturi are loc acidifierea, ce favorizează eliminarea zerului din coagul.

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 în 1 cm³ de concentrat se conțin minimum 10 miliarde UFC.

În funcție de starea fizică culturile starter se împart în: lichide, uscate, congelate, pe medii nutritive solide [87].

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.

Culturile lichide. Culturile pure (inoculum) lichide sau combinația de tulpini se adaugă în lapte steril degresat. Cultura prezintă un concentrat de microorganisme sub formă lichidă, puțin consistentă, de culoare alb-gălbuie sau brună. Avantajul acestor culturi bacteriene constă în faptul, că ele pot fi utilizate la prepararea maialelor imediat, întrucât microflora lor este mai activă [2,4].

Culturile uscate. Se obțin din masa bacteriană sau combinații de culturi lichide, prin uscare în mediu de protecție. Culturile uscate sunt identice cu concentratul bacterian uscat și diferă de acesta numai prin numărul de celule a bacteriilor lactice (aproximativ de 100 ori mai mici).

Concentratele bacteriene. Se obțin din culturi lichide, prin centrifugarea mediului la 15000 rot/min, când se elimină zerul și are loc o concentrare a celulelor la valori de 5-10⁹/g . Pot fi livrate la întreprinderi ca atare sau se pot congela și livra sub formă de concentrat bacterian uscat sau lichid [2, 172].

Culturile starter uscate (liofilizate) reprezintă un concentrat de bacterii, obținut prin uscarea culturilor concentrate lichide la temperaturi joase - liofilizare, ceea ce permite o afectare neesențială a celulei microbiene. Aceste culturi sunt ușor transportabile și pot fi păstrate un timp îndelungat (mai mult de 1 an) la temperaturi scăzute (4±5°C), de aceea culturile uscate au o utilizare mai vastă [16].

Consoțiile de tulpini de bacterii lactice sunt din punct de vedere tehnologic mai convenabile în comparație cu monocultura, deoarece sunt mai rezistente la acțiunea microflorei străine și liza bacteriofagilor [143, 169, 176]. Din experiența cercetătorilor în domeniu s-a

constatat, că cel mai reușit se combină tulpinile, care au același nivel de activitate acidifiantă.

În fabricarea industrială a brânzeturilor se utilizează maialele selecționate formate din una sau mai multe tulpini de bacterii lactice mezofile și termofile - *Str. thermophilus*, *Leuconostoc Lactococcus*, *Lactobacillus*. Totuși, maialele din bacterii lactice mezofile sunt folosite la prepararea unui număr mai mare de sortiment de brânzeturi decât cele termofile [4, 142].

Utilizarea *S. thermophilus* în compoziția culturii starter destinată fabricării brânzei are anumite avantaje:

- acidifierea este mai moderată din cauza capacității de tamponare a coagulului și ea favorizează sinereza. În acest fel se asigură o umiditate și un pH suficient de redus pentru ca mai apoi brânza să urmeze cu succes o lungă perioadă de maturare;
- ameliorează proprietățile organoleptice ale produsului: în cazul brânzeturilor celulele bacteriene vor elibera sisteme enzimatice care vor participa, de rând cu cheagul, la maturare.

Prin capacitatea de a intensifica proteoliza, utilizarea sa tehnologică modifică proprietățile reologice ale brânzei, contribuind la maturarea corectă a ei.

În timpul maturării brânzei, bacteriile lactice termofile prezente în număr mare la sfârșitul fabricației vor dispărea după un timp: *S. thermophilus* în timp relativ scurt, iar lactococii după o perioadă mai lungă. În brânză vor rămâne lactococii mezofili, pediococii și bacteriile propionice care vor degrada lactatul și vor forma ochiurile. Liza celulelor bacteriilor lactice termofile este însoțită de eliberarea de enzime proteolitice active care participă la maturarea brânzei. În cazul unei fermentări la temperatura 35-38⁰C, bacteriile lactice termofile se dezvoltă, dar cele mezofile, în special cele aromatice - dispar [4].

Pentru obținerea fiecărui tip de brânzeturi, se utilizează culturile starter, concentratele bacteriene compuse din microflora specifică. Sortimentul brânzeturilor și compoziția culturilor starter utilizate în tehnologie este prezentat în Tabelul 1.1 [142].

Culturile combinate folosite pentru fabricarea brânzei permit scăderea riscului de absență a coagulării din cauza schimbărilor de sezon în calitatea laptelui sau dezvoltarea bacteriofagilor, crearea și aplicarea compozițiilor noi de bacterii lactice permit obținerea unui produs stabil de înaltă calitate.

Deci, la alegerea maialelor pentru brânzeturi trebuie să se țină seamă nu numai de capacitatea lor de a produce acidifierea dorită, dar și de alte proprietăți metabolice, în special de capacitatea lor proteolitică pentru a se evita unele defecte de fabricație [4].

Tabelul 1.1. Culturi starter de bacterii lactice utilizate la fabricarea brânzeturilor [142]

Specii de bacterii lactice	Exemple de brânzeturi
Culturi starter mezofile	
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Cheddar, Feta, cottage, alte brânzeturi fără găuri
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>L.lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> <i>Leucon. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	Gouda, Tilsiter, Samsø Brânzeturi moi cu mucegai (Camembert, Port Salut)
Culturi starter termofile	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Mozzarella, Brie, Swiss
<i>S. thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Mozzarella Brânză pentru pizza
<i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Brânzeturi elvețiene (tip Swiss), Grana
Culturi starter mixte (multiple)	
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>S. thermophilus</i>	Cheddar
<i>L.lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>S. thermophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i>	Feta Brânzeturi albe
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	Brânzeturi cu cheag (cu temperatura joasă de închegarea a doua)
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>Lb. helveticus</i>	Brânzeturi cu cheag (cu temperatură ridicată de închegarea a doua)
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>Lb. casei</i>	Brânzeturi în saramură

În ultimii ani în industria laptelui sunt utilizate culturile starter importate din alte țări și aparți companiilor „Danisco”, „Dr.Hansen”, „Hanna” „Igea”. Aceste culturi nu au efectul tehnologic așteptat deoarece nu sunt adaptate la materia prima autohtonă și condițiile de producere ale întreprinderilor din țară, de asemenea sunt costisitoare, ceea ce influențează prețul produsului final.

Astfel, elaborarea asociațiilor simbiotice noi de bacterii lactice din diferite grupuri taxonomice este una dintre direcțiile de perspectivă necesare și avantajoase. Implicarea culturilor starter mixte din bacterii lactice mezofile și termofile permite dezvoltare simultană a ambelor tipuri de microorganisme la temperaturi de 28-32⁰C, contribuind la:

- stabilizarea procesului tehnologic cu indicatori specifici de calitate și siguranță;

- îmbunătățirea proprietăților probiotice datorate substanțelor biologic active sintetizate de către tulpinile de bacterii probiotice selectate în mod special;
- îmbunătățirea parametrilor organoleptici ai produselor;
- creșterea valorii biologice a produselor;
- creșterea duratei de valabilitate a produsului finit;
- extinderea gamei de produse [3].

Numeroase publicații relatează despre avantajul utilizării culturilor starter autohtone în procesul de fabricare a brânzeturilor în comparație cu unele culturi starter comerciale.

Selectarea în calitate de materie primă a laptelui de înaltă calitate și implementarea culturilor de bacterii lactice autohtone cu proprietăți tehnologice valoroase sunt cele mai importante etape în tehnologia de fabricare a brânzei.

1.4 Tehnologia de fabricare a brânzei din lapte de capră

Reglementarea tehnică definește termenul „**brânză**” – produs proaspăt sau maturat, cu pastă moale, semitare, tare sau extra tare, în care raportul dintre proteinele serice și cazeină nu depășește acest raport în lapte. Deosebim brânza maturată și brânza nematurată.

Brânza nematurată – brânza care este gata pentru consum la scurt timp după fabricare.

Brânza maturată – brânza care, nu este gata pentru consum la scurt timp după fabricare, urmând să fie păstrată un anumit timp la temperatură și condiții speciale care determină modificările biochimice și fizice caracteristice brânzei în cauză [18].

Brânzeturile reprezintă o sursă importantă de factori nutritivi, cu valoare biologică înaltă, concentrați într-un volum mic și cu digestibilitate înaltă. Valoarea nutritivă a brânzeturilor este determinată de conținutul important de substanțe proteice și grăsimi ușor asimilabile, săruri minerale de calciu, fosfor, magneziu, sodiu și clor precum și vitamine. Prin concentrarea de grăsimi în coagulul obținut la precipitarea cazeinei, brânzeturile devin o sursă de vitamine liposolubile A, D, E, K mai importate decât laptele. Conținutul de lactoză și vitamine hidrosolubile este mai scăzut deoarece acestea trec în zer. Conținutul de calciu al brânzeturilor depinde de felul în care a fost realizată închegarea laptelui, fiind mai mare la coagularea cu cheag și mai scăzut în cazul coagulării prin acidifiere naturală. Brânzeturile cu conținut mai mic de grăsime, de exemplu brânza de vacă și urda, au un caracter dietetic și pot fi consumate de către persoanele ce suferă de anumite boli în care consumul de grăsimi este contraindicat [10].

Brânza se fabrică prin două metode – metoda separată (din lapte degresat cu adăugarea de frișcă) și metoda tradițională (din lapte normalizat). În procesul de fermentare brânza poate fi

obținută prin fermentare acidă, termo-acidă sau acidifiere cu cheag [142]. Metoda separată de fabricare a brânzei include următoarele etape: recepția și pregătirea materiilor prime, fabricarea brânzei cu conținut scăzut de grăsime, amestecarea brânzei cu frișcă, ambalarea și etichetarea produsului finit. Dezavantajul acestei metode constă în procesul tehnologic îndelungat și costisitor.

Tehnologia de fabricare a brânzei prin metoda tradițională are un avantaj deosebit – permite obținerea produsului finit de etalon cu consistența fină și moale [142]. Brânzeturile obținute din lapte de capră se caracterizează prin conținutul mai sporit de proteină, reprezentat de 75-80 % cazeină, particularitate deosebit de utilă în transformarea lui în brânză [34].

Tehnologia de obținere a brânzeturilor include un complex de metode biotehnologice independente, bazate pe cele mai complexe procese fizico-chimice, biochimice, microbiologice și reologice care provoacă schimbări profunde în aproape toate componentele laptelui la nivelul macro-, micro- și submicrostructurilor. Derularea acestor procese depinde de mulți factori și trebuie să fie monitorizată în timpul fabricării brânzei pentru a obține un produs finit de calitate înaltă, cu proprietăți caracteristice de gust, aromă și consistență a acestui tip produs.

Tehnologia de fabricare a brânzei prin metoda tradițională include operațiunile, indicate în Figura 1.3.

Laptele destinat fabricării brânzei este recepționat, filtrat și curățat de impuritățile conținute și ulterior este supus prelucrării. Proprietățile laptelui prelucrat, a culturii lactice utilizate și parametrii tehnologici influențează indicii organoleptici și fizico-chimici (fracția masică de grăsimi, fracția masică de umiditate, fracția masică de clorură de sodiu) ai oricărui tip de brânză.

În funcție de tipul produsului fabricat, se face normalizarea conținutului de grăsime al laptelui. Această practică se folosește în tehnologia obținerii brânzeturilor, deoarece fiecare sortiment de brânză are un anumit conținut de grăsime raportat la substanța uscată. Fracția masică de grăsimi în substanța uscată a brânzei este reglementată prin normalizarea laptelui prelucrat. Cantitatea de grăsimi afectează formarea consistenței produsului, precum și valoarea nutritivă a acestuia. Trebuie remarcat faptul, că cu cât e mai mic conținutul de grăsime în brânză, cu atât mai mare este conținutul de umiditate și invers. Umiditatea și gradul de sărare a brânzei determină intensitatea proceselor microbiologice și biochimice care apar în masa brânzei maturate. Necesitatea vizualizării și ajustării acestor factori determină apariția diferitor defecte în brânză [174].

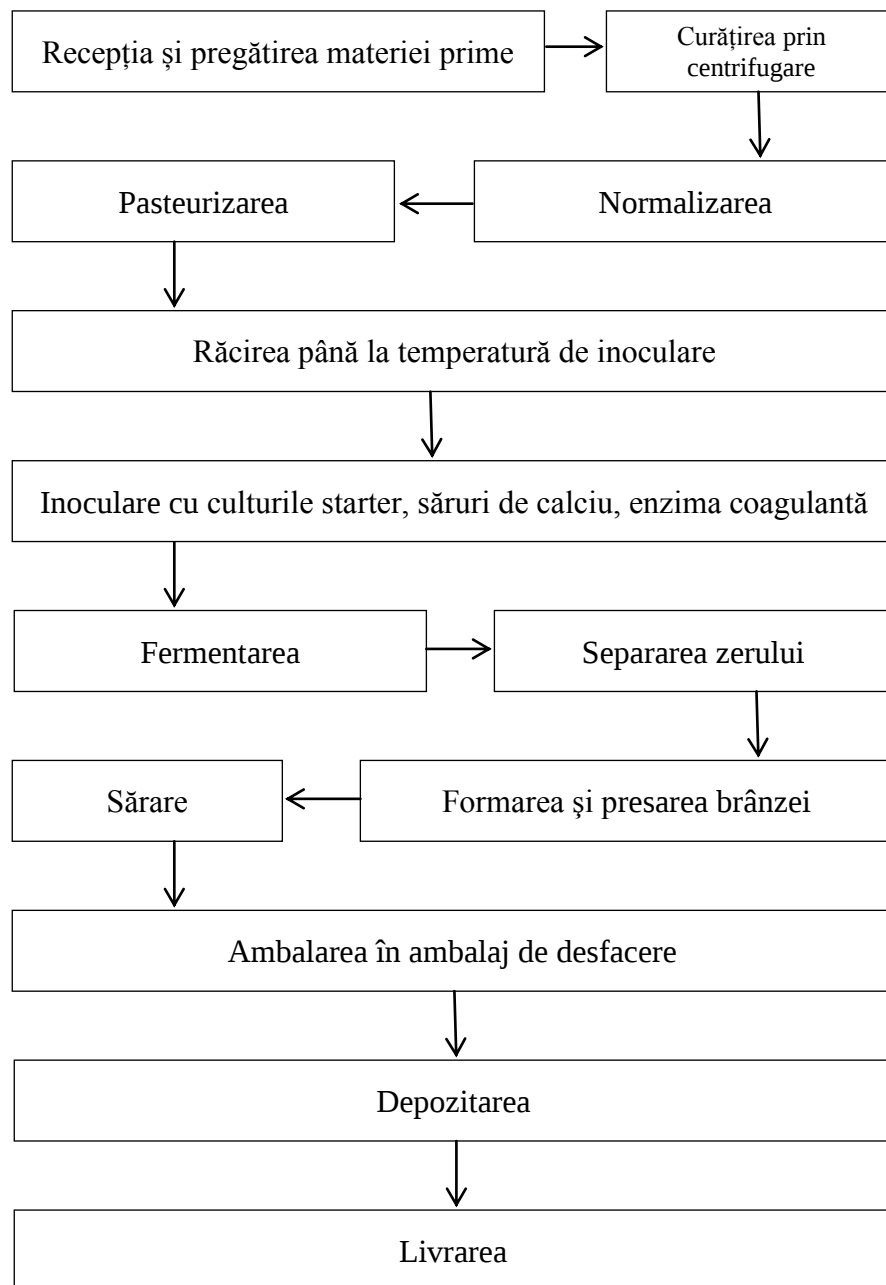


Fig. 1.3. Fluxul tehnologic general de fabricare a brânzei [16]

Maturarea laptelui se realizează în cazul necesității prin menținerea materiei prime normalizate la temperatura de $10 \pm 2^\circ\text{C}$ timp de 12 ± 2 ore până la aciditatea $19-20^\circ\text{T}$ cu sau fără adaos de cultura starter.

Laptele normalizat destinat fabricării brânzeturilor se pasteurizează la temperaturi înalte, respectiv $78 \pm 2^\circ\text{C}$ timp de 15-20 sec. Imediat după pasteurizare, laptele se răcește până la temperatura de coagulare $32-35^\circ\text{C}$.

În materia primă cu temperatura 20-24°C se introduc 1-5% de maia (cultură), preparată special pentru fabricarea sortimentului dat de brânzeturi. Cantitatea de cultură starter introdusă se reglează în funcție de activitatea acesteia și calitatea materiei prime. Gustul și aroma brânzeturilor, cât și consistența coagulului sunt determinate în mare măsură de componența și proprietățile microflorei maialelor (culturilor starter). Pentru brânzeturi trebuie să se utilizeze maiale foarte active cu o aciditate redusă.

Etapă de fermentare a laptelui în tehnologia de producere a brânzei se realizează în baza transformărilor biochimice și fizico-chimice ale componentelor laptelui care trec în produs. Elementele de bază pentru fabricarea brânzei sunt procesele biochimice care au loc sub acțiunea sistemelor enzimatic bacteriene și a enzimelor utilizate. În același timp, proteinele se descompun într-o serie întreagă de substanțe azotate, dintre care peptidele și aminoacizii sunt principalii compuși responsabili de formarea gustului. În rezultatul activității bacteriilor lactice se fermentează lactoza, se stabilește pH-ul mediului și potențialul redox, care creează condiții pentru fermentarea ulterioară a cașului. Produsele obținute în procesul heterofermentativ participă la crearea aromei, iar dioxidul de carbon creează desenul brânzei. Procesele enzimatic sunt însoțite de formarea unui număr mare de compuși, de calitatea și cantitatea cărora depinde gustul și aroma produsului [144, 155].

Prin urmare, microflora creată de bacteriile lactice este factorul principal în obținerea unui produs de calitate, deoarece influența altor factori de maturare este limitată. Reglarea procesului de fermentare este cel mai important element în producerea brânzeturilor. Îmbunătățirea tehnologiei pentru asigurarea calității înalte și stabile a produsului este întotdeauna legată în mod direct de procesul fermentării [163].

După introducerea maielei, masa se amestecă și se lasă pentru fermentare. O importanță mare în formarea proprietăților organoleptice ale produsului o are temperatura de fermentare, care depinde de speciile de bacterii folosite în maia. La fabricarea produselor fermentate cu cultura microbiană compusă din bacterii mezofile și termofile, temperatura de fermentare se stabilește la nivelul de 28-32°C. Acest regim termic permite o dezvoltare normală a ambelor specii de microorganisme.

Pentru fabricarea brânzeturilor, în lapte se adaugă cheagul care are un rol special în derularea procesului tehnologic, în deosebi la maturarea brânzeturilor. La producerea oricărui tip de brânză, o anumită cantitate de enzime proteolitice active este reținută în caș (2-6%), iar restul trece în zer. Partea rămasă în brânză rămâne activă și continuă să descompună cazeina în timpul maturării. Atât cantitatea cât și specificitatea produselor de descompunere a proteinelor sunt

factori importanți în formarea gustului și structurii brânzeturilor [178]. Se știe că laptele de capră este caracterizat printr-un conținut mai mare de calciu [2]. Din surse bibliografice s-a constatat că o creștere a dozei de clorură de calciu sporește gradul de utilizare a cazeinei, precum și raportul Ca/P în cheag [177].

Deci, pentru coagularea laptelui și obținerea brânzei, laptele se însămânțează cu o cultură pură de bacterii lactice, se adaugă clorura de calciu și cheag. Cantitatea de clorură de calciu variază între 15 – 40 gr soluție la 100 litri lapte. Soluția de clorură de calciu se prepară din 650 grame CaCl_2 dizolvată în 350 cm^3 apa. După amestecare timp de 10-15 min, laptele se menține până la atingerea acidității de $60-70^\circ\text{T}$, care asigură coagularea laptelui în cel mult 6-10 ore sau 4-6 ore prin metoda accelerată cu utilizarea maialei simbiotice mixte. Finalizarea procesului de coagulare se determină după caracterul coagulului, care trebuie să fie potrivit de compact și să se divizeze la agitare. Durata coagulării este de 15 – 90 minute, în funcție de tipul de brânză și de temperatura de coagulare.

Prelucrarea ulterioară a coagulului are drept scop eliminarea zerului și se realizează prin tăierea și presarea acestuia. Pentru eliminarea zerului, coagulul format se taie. Zerul eliminat este transparent de culoare verzuie-deschisă. Pentru prelucrarea coagulului este nevoie de o crintă, căuș pentru scoaterea cheagului și o sedilă. Coagulul se scoate cât mai repede pentru a nu se răci deoarece răcirea acestuia împiedică eliminarea zerului, iar sfărămarea duce la pierderea de substanță uscată. După 10 minute se procedează la prima tăiere a coagulului, iar peste 10-15 minute se face tăierea a două, după care coagulul este supus formării și presării. Presarea este foarte importantă deoarece această operațiune contribuie la eliminarea atât a zerului, cât și a aerului din coagulul. Dacă presarea este foarte puternică, odată cu eliminarea zerului se poate elimina și o cantitate importantă de grăsime și cazeină. De aceea este necesar săse i-a în calcul, că greutatea finală a unui kilogram de brânză poate fi de 0,5-1,0 kg și durata de presare poate varia între 45-90 minute, iar procesul se consideră încheiat atunci când zerul se scurge în picături rare și este limpede [10]. Coagulul obținut, bine scurs, se introduce în forme cilindrice sau dreptunghiulare acoperite cu sedilă și cu partea inferioară perforată pentru eliminarea zerului [142].

Cașul obținut după presare se pune la sărare. Sărarea brânzei se realizează în două etape – sărarea umedă și uscată. Sărarea umedă se realizează prin menținerea bucăților de brânză timp de 14-16 ore în saramură cu concentrația de sare de 20-22 %, iar sărarea uscată - prin presărarea bucăților de brânză cu sare grunjoasă după scoaterea acestora din saramură. Durata sărării uscate

constituie 24 ore și continuă în ambalaj. Brânzeturile în saramură se deosebesc de alte tipuri prin faptul că se maturează și se păstrează în saramură.

Baza maturării și formării parametrilor organoleptici ai brânzeturilor o constituie transformările enzimaticale ale componentelor laptelui, cu formarea de numeroși compuși de gust și aromă specifice a produsului [122, 144, 151, 154]. Cele mai importante transformări în timpul maturării le suferă lactoza, substanțele proteice și grăsimea.

Lactoza, în urma reacției de glicoliză, este transformată mai întâi în acid piruvic și mai apoi în acid lactic care, intră în reacție cu calciul din paracazeinatul de calciu formând lactatul de calciu, precum și alte săruri. În acest mod boabele de coagul se lipesc, rezultând o masă omogenă.

Substanțele proteice în formă de paracazeinat de calciu, prin reacția de proteoliză (hidroliza parțială a cazeinei), formează peptone și albumoze. Prin continuarea hidrolizei peptonele se descompun în aminoacizi, substanțe determinante în obținerea gustului și aromei brânzeturilor, iar o parte a acestora trec în amoniac și bioxid de carbon.

Procesul de proteoliză este influențat de diverse enzime proteolitice: proteaze ale laptelui, proteaze din preparatele enzimatiche. Enzima cheagului, datorită specificității înalte a chimozinei care intră în compoziția sa, are un efect limitat asupra cazeinei în timpul maturării brânzei, exprimându-se mai ales la schimbarea consistenței produsului. Alte modificări ale proteinelor în timpul maturării brânzeturilor au loc sub acțiunea proteinazelor și peptidazelor produse de culturile de bacterii lactice [121].

Grăsimile, în primă fază a reacției de lipoliză, se transformă în glicerină și acizi grași, fenomen valabil pentru toate sortimentele de brânzeturi. El este mai accentuat la sortimentele cu maturare în prezența mușcăiurilor, când acizii grași sunt hidrolizați până la aldehide și cetone, conferind aroma specifică, de rând cu acidul propionic și acidul acetic [3].

Brânza obținută după sărare se ambalează în folie polimerică, prevenindu-se astfel contactul cu mediul înconjurător - aer, lumină, umiditate, deshidratarea (uscarea), infectarea cu microorganisme, și se maturează timp de 15-20 zile. În cazul brânzei în saramură ambalarea se face în butoaie din lemn, interiorul cărora se căptușește cu un sac de polietilenă sau alt material, pentru a preveni scurgerea saramurii. Pe fundul ambalajului se presăra un strat de sare grunjoasă, iar bucățile de brânză se așează în straturi compacte fără a lăsa goluri. Butoiul umplut se lasă 1-2 zile pentru autopresare, se toarnă saramură și se lasă la temperatura de 10-12°C pentru maturare. După 15-20 zile de maturare brânza este gata pentru livrare.

Brânzeturile se depozitează la temperatura de 2-6°C în camere frigorifice curate, dezinfectate în care lipsesc mirosuri străine, durata de păstrare fiind de 12 luni. În depozitele amenajate, subsoluri temperatura nu trebuie să depășească 12 °C , durata de păstrare fiind de 4 luni [16, 142].

1.5 Concluzii la capitolul 1

1. Laptele de capră, prin elementele nutritive ce le conține și forma lor ușor asimilabilă, reprezintă un aliment funcțional complet. Importanța laptelui de capră în calitate de materie primă valoroasă pentru producția industrială de produse lactate este bine studiată, dar diversitatea compoziției microbiologice a acestui produs valoros îl face relevant pentru cercetarea științifică în continuare.
2. Conform rezultatelor studiilor deja realizate, un rol important în fabricarea produselor lactate fermentate îl au microorganismele prezente în materia primă, care prin activitatea lor vitală asigură proprietățile specifice fiecărui produs. Bacteriile lactice sunt creditate cu merit deosebit în ce privește proprietățile nutriționale și terapeutice, ce le conferă produselor lactate fermentate: ameliorarea digestiei și biodisponibilității componentelor produselor lactate, inhibarea microflorei patogene a tractului digestiv, supresia cancerului, atenuarea intoleranței la lactoză și efectului antiolesterol.
3. În scopul dirijării proceselor biochimice și obținerii produselor lactate cu proprietăți organoleptice superioare, în tehnologia laptelui se folosesc culturi pure de bacterii special selecționate, fapt ce asigură un efect dublu – tehnologic și igienic. Un avantaj în acest sens îl prezintă utilizarea în componența culturilor starter a tulpinilor de bacterii lactice homofermentative și heterofermentative.
4. Valorificarea tulpinilor microbiene izolate din habitatul lor natural permit selectarea bacteriilor lactice adaptate la calitatea materiei prime, cu proprietăți biotehnologice sporite sigure și stabile, fapt ce permite de a obține produse lactate de calitate înaltă.
5. Creșterea volumului de fabricare a produselor din lapte de capră și lipsa culturilor starter special orientate obținerii produselor din lapte de capră, argumentează necesitatea și evidențiază actualitatea cercetărilor orientate spre izolarea din lapte de capră, identificarea și selectarea bacteriilor lactice autohtone cu proprietăți biotehnologice valoroase pentru industria laptelui.

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 tulpinilor noi de bacterii

lactice mezofile și termofile de importanță tehnologică în scopul utilizării lor în componența culturilor starter autohtone pentru fabricarea produselor lactate fermentate din lapte de capră.

Direcțiile de rezolvare a problemei de cercetare au constat în următoarele: realizarea screening-ului bacteriilor lactice izolate din lapte de capră crud în scopul obținerii culturilor active și stabile din punct de vedere biotehlogic; aplicarea tulpinilor selectate în culturi starter și utilizarea lor în procesul de fabricare a produselor lactate fermentate din lapte de capră.

Scopul lucrării a constat în selectarea tulpinilor de bacterii lactice cu potențial biotehlogic valoros pentru industria laptelui și utilizarea lor în compoziția culturilor starter destinate fabricării produselor lactate fermentate 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 tehnologic 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.

2. OBIECTELE DE STUDIU ȘI METODELE APLICATE ÎN CERCETARE

Cercetările științifice destinate izolării, identificării și selectării bacteriilor lactice din laptele crud de capră de interes biotehnologic au fost efectuate în perioada anilor 2014-2018 în laboratorul de Biotehnologii alimentare din cadrul Direcției „*Tehnologii Alimentare*” a Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare (IȘPHTA) din Republica Moldova.

2.1 Obiectele de cercetare

În calitate de obiecte de studiu au fost utilizate tulpinile autohtone de bacterii lactice izolate din probe de lapte crud de capră din Republica Moldova și tulpini de referință depozitate în diverse Colecții de Microorganisme.

2.1.1 Tulpinile autohtone de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* și *Streptococcus thermophilus* au fost izolate din habitat natural – lapte crud de capră din diferite regiuni ale Republicii Moldova, identificate și depozitate ulterior în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie și în Colecția Ramurală a Laboratorului de Biotehnologii Alimentare IȘPHTA. Schema cercetării izolatelor naturale în scopul valorificării lor în biotehnologia produselor lactate este prezentată în Figura 2.1.

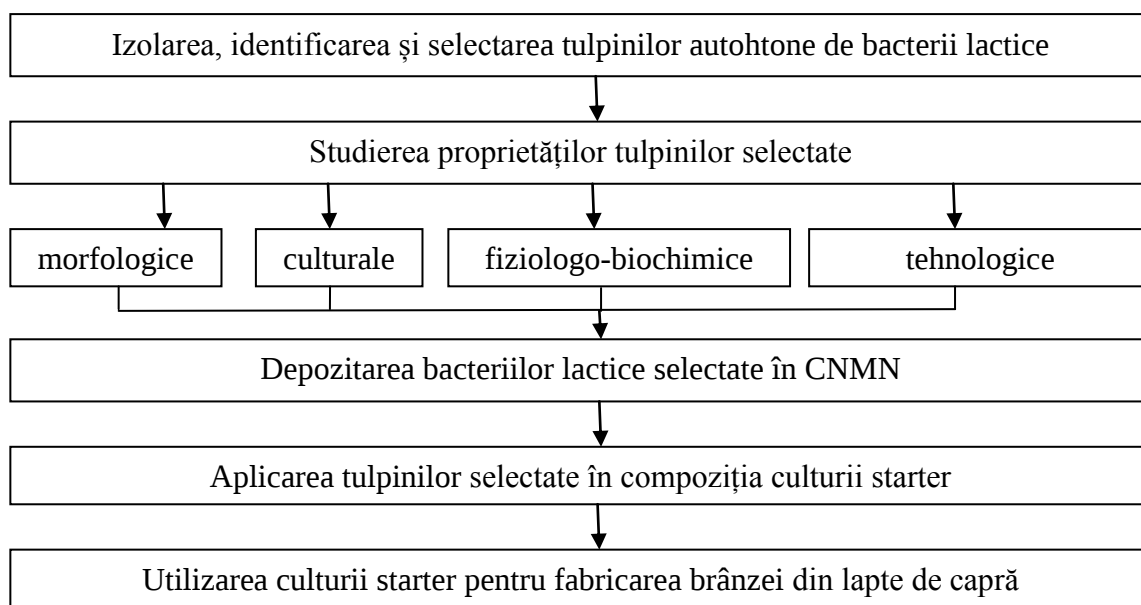


Fig. 2.1. Schema cercetărilor ale izolatelor de bacterii lactice

Bacteriile lactice utilizate în biotehnologiile alimentare au statut GRAS fiind utilizate pe scară largă în producția de alimente fermentate în condiții de siguranță alimentară [57, 85].

Procedura de izolare a culturilor pure de microorganisme lactice s-a efectuat prin inoculări periodice (minimum de 10 ori) în lapte degresat steril până la formarea coagulului dens. După etapa de îmbogățire probele heterogene selectate au fost însămânțate și incubate pe mediu nutritiv solid - în lapte degresat steril [77]. Pentru obținerea coloniilor de cultură pură probele au fost însămânțate în 6 eprubete, dintre care 2 au fost incubate în termostată la 30°C, 2 – la 37°C și 2 – la temperatura de 45°C.

Selectarea tulpinilor autohtone de bacterii lactice s-a efectuat în conformitate cu schema prezentată în Figură 2.2.

Fiecare tulpină nouă de microorganisme a fost descrisă conform caracteristicilor specifice unei culturi pure de microorganisme.

Pentru identificarea izolatelor sunt examinate particularitățile morfologice, culturale, fiziologo-biochimice și tehnologice [93, 109].

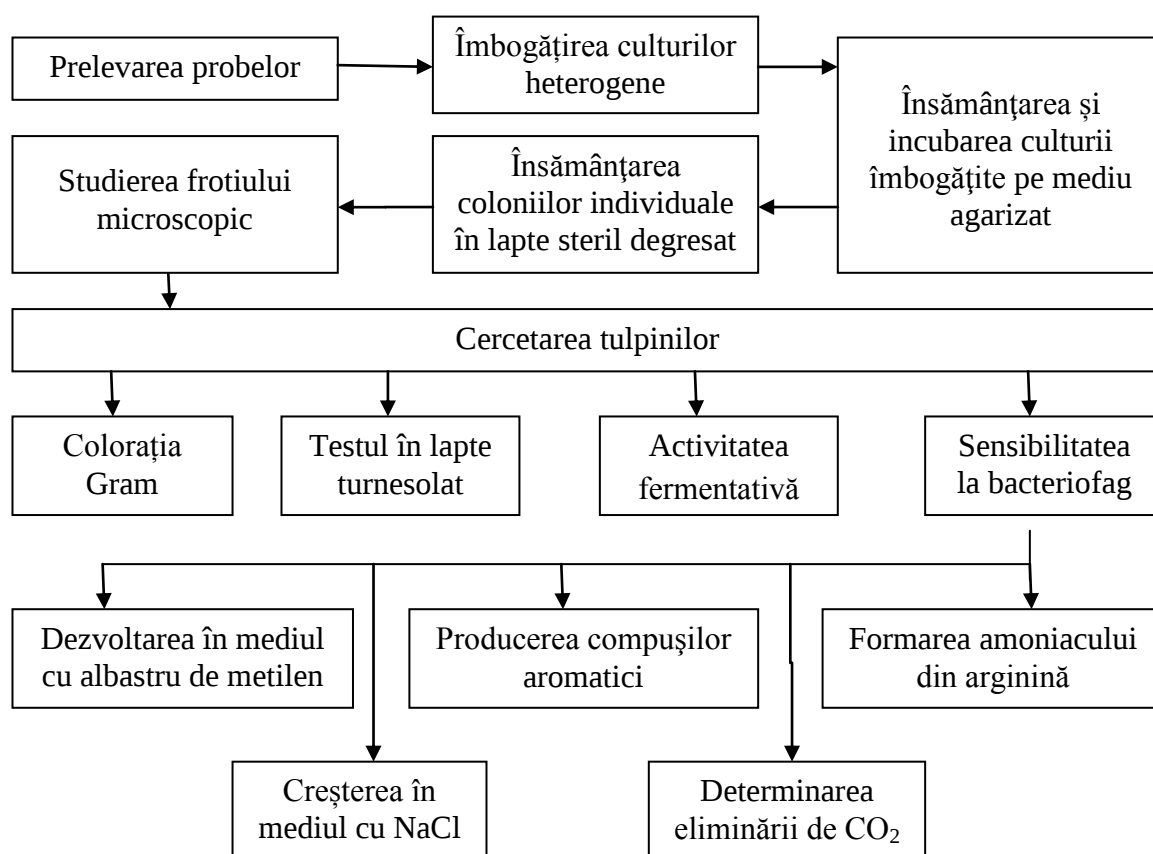


Fig. 2.2. Schema etapelor de selectare a tulpinilor de bacterii lactice de importanță biotehnologică

Descrierea detaliată a izolatelor bacteriene obținute este prezentată în capitolul 3 „Selectarea tulpinilor autohtone de bacterii lactice din lapte de capră”. În baza tulpinilor autohtone selectate a fost elaborată **cultura starter mixtă BriCheese**, supusă în continuare investigațiilor ca obiect de studiu aparte. Cultura starter a servit la fabricarea în condiții industriale a **mostrelor de brânză**, proprietățile cărora au fost studiate în capitolul final al lucrării.

2.1.2 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).

Tulpina de referință *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) prezintă bacili Gram–negativi din grupa bacteriilor coliforme. Tulpină se dezvoltă în condiții aerobe, pe mediul tripticază soia (lichid sau geloză), cu temperatura optimă de cultivare de 37°C. Tulpina este recomandată în calitate de cultura de referință pentru determinarea susceptibilității la antibiotice.

2.1.3 Cultura de referință *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™) a fost 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 de formă sferică, lipsite de capsulă, Gram-pozitive, aerobe, la microscop apar sub forma de aglomerări asemănătoare unui ciorchine. Aceasta tulpină se cultivă pe mediul tripticază soia la temperatura optimă de 37°C. La cultivare pe medii solide formează colonii mari, de tip sferice, de culoare galben-aurie.

2.2 Mediile nutritive utilizate în studiu

Pentru cultivarea bacteriilor lactice din specii *L. lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. lactis* biovar *diacetylactis*, *L. lactis ssp. cremoris* și *S. thermophilus* au fost utilizate mediile nutritive după cum urmează:

➤ *Lapte hidrolizat*. Laptele degresat se sterilizează la 0,2 MPa timp de 10-15 min și se răcește pînă 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 – 1,0 g/l pancreatină;

peste câteva minute se adaugă 5 ml de cloroform. Vasul se închide cu un dop și se pune în termostat la temperatura de 40°C timp de 24 ore. 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 [169, p.95];

➤ *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, după ce se topește în condiții de 1 atm timp de 15 min. Mediul obținut se distribuie în vasele cu volumul necesar și se sterilizează 10 min în condițiile de 1 atm (121 ± 2)°C [119, p.297].

➤ *Laptele degresat sterilizat.* Laptele degresat (natural sau restabilit) se sterilizează în condițiile de 1 atm (ce corespunde temperaturii de 121 ± 2 °C) în eprubete sau vase din sticlă cu volumul de 0,1 – 2,0 L timp de până la 10 min. Un indice indirect de eficacitate a procesului de sterilizare este obținerea culorii crem-deschis a laptelui [119, p.297];

➤ *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 etilic și se extrage la 37°C timp de 3 zile, schimbând zilnic alcoolul; sedimentul se usucă în termostat, 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. [169, p.97];

➤ *Mediul pentru determinarea fermentării hidraților de carbon.* La 100 ml lapte hidrolizat steril (pH 6,7 - 6,8) se adaugă 1,0 ml soluție sterilă de indicator Andrade. Hidrații de carbon se adaugă în formă de soluție de 10%, sterilizată la vapori curenți [169, p.97];

➤ *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 se încălzește până la dizolvarea completă a componentelor, apoi se răcește până la temperatură de 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.

➤ *Mediu solid pentru diferențierea lactococilor producători de aromă.* Compoziția mediului: lapte hidrolizat 1000 ml, autolizat de drojdie – 5 %, saharoză – 1 %, citrat de calciu – 1 %, agar – 1,5%. La laptele hidrolizat se adaugă autolizat de drojdie, zaharoză, citrat de calciu și agar; se corectează pH 6,5. Se sterilizează la 0,1 MPa (121°C) timp de 10-15 min.[169, p.96].

2.3 Metodele de cercetare

Pentru realizarea studiului asupra bacteriilor lactice au fost utilizate metode microbiologice, biochimice, fizico-chimice clasice de investigare. Pentru optimizarea mediului de liofilizare au fost utilizate metode matematice de planificare, datele experimentale obținute au fost prelucrate prin analiză statistică. Brânza obținută din lapte de capră a fost caracterizată conform standardelor corespunzătoare [40, 41, 64, 72, 91, 109].

2.3.1 Microscopie

Proprietățile morfologice ale bacteriilor lactice selectate au fost studiate prin microscopie, utilizând microscopul OPTTECH; analizele microscopice s-au efectuat cu obiectivul de imersie cu puterea de mărire 100x. A fost estimată forma, mărimea, amplasarea celulelor și absența bacteriilor străine în frotiu.

Vizualizarea coloniilor s-a efectuat cu ajutorul microscopului stereoscopic MБC-6 cu putere de mărire 6x. Fotografiiile au fost obținute utilizând camera digitală Power Shot SX170 (CANON, Japonia).

Pentru vizualizarea bacteriilor au fost pregătite preparate fixe colorate. 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 colorant pe timp de 1-2 minute. Frotiul se spală cu apă distilată până la obținerea culorii albastră-pală, urmat de uscare [119, p.323].

Colorația Gram

Frotiul pregătit se usucă la temperatura camerei și apoi se fixează asupra flăcării. Frotiul fixat se acoperă 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 microscopice se spală cu apă distilată și se acoperă cu fucsină timp de 30-60

sec. Se îndepărtează fucsina și se spală frotiul cu apă de robinet, după uscare se examinează la microscop la 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 [119, p. 324].

2.3.2 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 [169, p.83].

2.3.3 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 după care 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, dar culturile mezofile nu coagulează și nu reduc [74].

2.3.4 Determinarea rezistenței bacteriilor la temperaturi înalte

Rezistența bacteriilor lactice la temperaturile înalte se verifică în felul următor: laptele degresat și sterilizat se repartizează în eprubete câte 10 ml și se inoculează tulpina cercetată cu ansa. În continuare eprubetele se introduc în baia de apă la temperatura 60°C sau 65°C timp de 30 min, apoi se răcesc. În final probele se termostatează la temperatură optimă timp de 48 ore pentru a urmări dacă tulpinile au rezistat la temperaturi. Creșterea sau lipsa creșterii se determină vizual după reacția de coagulare și prin microscopie [169, p.77].

2.3.5 Determinarea capacității de fermentare a carbohidraților

Pentru prepararea mediului destinat determinării capacității bacteriilor lactice de a fermenta hidrați de carbon, la 100 ml lapte hidrolizat steril (pH 6,7 - 6,8) se adaugă 1,0 ml soluție sterilă de indicator Andrade. De asemenea, se adaugă câte 0,2 ml soluție de carbohidrat (lactoză, ramnoză, zaharoză ș.a.) de 10% (supuse sterilizării la 112°C și 0,5 atm.), se adaugă tulpina studiată și se cultivă la temperatura optimală 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 [169, p.84].

2.3.6 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/maro indică capacitatea tulpinii de a hidroliza arginina. Dacă cultura cercetată nu formează amoniac - mediul rămâne străveziu. Se diferențiază *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, care au reacție negativă [169, p.75].

2.3.7 Determinarea creșterii în mediul cu clorură de sodiu

În mediul de lapte hidrolizat se adaugă NaCl în cantitate de 2%, 4%. Se inoculează cu tulpinile testate (o ansă la 10 ml) și se incubează la temperatura optimă timp de 24 - 48 ore. La sfârșitul perioadei de termostatare se constată prezența sau absența creșterii [119, p.183].

2.3.8 Determinarea dezvoltării în mediul cu albastru de metilen

Testul se efectuează în lapte degresat steril cu adaos de 0,1% soluție albastru de metilen înșămânțat cu cultura cercetată și 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 [119, p.184].

2.3.9 Determinarea rezistenței bacteriilor lactice la mediul alcalin

Se determină capacitatea de creștere a culturii cercetate în lapte hidrolizat cu pH alcalin stabilit (pH-ul 9,2 pentru streptococii termofili și pH-ul 9,6 pentru lactococii mezofili), care se obține cu ajutorul soluțiilor sterile de NaOH (2N) și H_3PO_4 (2N). Culturile se termostatează la temperatura de 30°C pentru lactococii mezofili și la temperatura de 40°C pentru streptococii termofili (timp de 48 ore). Creșterea sau lipsa creșterii se determină vizual după prezența sau lipsa turbidității. Se examinează selectiv la microscop [169, p.78].

2.3.10 Determinarea rezistenței bacteriilor lactice la bilă

Testul se efectuează în lapte degresat steril cu adaos de bilă (20% și 40%) înșămânțat cu cultura cercetată (o ansă la 10 ml), incubat 48 ore la temperatura optimă și se urmărește

coagularea. La sfârșitul perioadei de termostatare se apreciază creșterea sau absența ei [119, p.184].

2.3.11 Determinarea producerii compușilor aromatici

Metoda constă în determinarea prezenței diacetilului+acetonei după proba alcalină prin proba bazică (KOH de 40%) și urmărirea apariției colorației roze. Pe o placă de porțelan albă se depun 2 picături de cultură cercetată (în faza de 17 - 18 ore dezvoltare) și două picături de KOH soluția de 40 % și se amestecă. Peste 20 - 25 minute se constată apariția sau lipsa colorației roze. Se selectează tulpinile ce au prezentat colorație roză - reacție pozitivă la producerea compușilor aromatici [119, p.188].

2.3.12 Determinarea eliminării de CO₂

Metoda constă în determinarea măririi nivelului coagulului 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 de asupra zerului crește de la 0,6 până la 2-3 cm și mai mult [169, p.76].

2.3.13 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 temperaturi optime timp de 12 ore. Hidroliza esculinei este indicată de înnegrirea mediului din jurul coloniilor [63].

2.3.14 Identificarea tulpinilor de bacterii lactice mezofile lizogene prin metoda de fagotipare

Esența metodei constă în diferențierea tulpinilor lizogene cu ajutorul bacteriofagilor. Testul se efectuează în mediul nutritiv lichid, solid (1,5% agar) și semi-solid (0,75% agar) pe bază de lapte hidrolizat și apa distilată (1:2).

O ansă de cultură cercetată se adaugă în 10 ml de mediu lichid, se termostatează la temperatură de 30°C timp de 5-6 ore, apoi se adăugă cloroform (10:1). Suspensia se centrifughează la 418-523 rpm timp de 30 de min. 1,0 ml de supernatant se amestecă cu 0,1 ml de cultură indicator și 4 ml de mediu semi-solid. Se agită pentru omogenizare, se repartizează pe

mediul solid și se incubează la temperatura de 30°C timp de 17 ore. Se diferențiază coloniile galbene, opace, tipice pentru culturile lizogene de bacterii lactice mezofile [119, p.182].

2.3.15 Determinarea activității de coagulare a laptelui inoculat

Laptele integral fiert se inoculează cu 3% de cultură - inoculum (după 16 – 18 ore dezvoltare) și se termostatează la temperatura optimă până la coagulare. Se urmărește timpul în care s-a format coagulul [119, p.181].

2.3.16 Determinarea duratei de coagulare a laptelui

Activitatea fermentativă a tulpinilor de bacterii lactice termofile a fost estimată pe mediul cu lapte degresat. În eprubetele cu lapte se adăugă 3-5% de tulpină cercetată și se observă durata de coagulare a laptelui [169, p.13].

2.3.17 Determinarea capacității de sinereză

Proba de lapte fermentat cu masa cunoscută se menține în frigider la temperatura de 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 [97].

2.3.18. Evaluarea activității de acidifiere

Activitatea de acidifiere a tulpinilor de bacterii lactice 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 temperaturi optime 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 [14]. 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 estimată după 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 soluțiile 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 adăugă 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.

2.3.19. Determinarea producerii de acid lactic

Acumularea acidului lactic se urmărește după fermentarea laptelui de către culturile studiate. Aciditatea se determină prin titrare cu NaOH 0,1N (conform 2.3.18). Pentru determinare se ia în considerație faptul ca 1 ml NaOH 0,1N corespunde 0,009 g acid lactic.

2.3.20. Determinarea parametrilor de creștere a culturii periodice

Rezultatele unui studiu cantitativ al creșterii populațiilor microbiene pot fi prezentate mai informat și mai precis dacă sunt analizați diferiți parametri de creștere: rata specifică de creștere, timpul de generare (timpul de dublare a biomasei), etc.

Rata specifică de creștere a culturii se calculează din datele concentrației de biomasă în fazele de creștere activă ale culturii conform formulei 2.1 [130]:

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{T_1 - T_0} \quad (2.1)$$

unde:

X_0 și X_1 – valoarea biomasei în timp de creștere T_0 și T_1 ;

Timpul acumulării biomasei - în condiții favorabile de mediu, celule se vor multiplica într-o progresie geometrică, adică exponențial, se calculează conform formulei 2.2:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{sau} \quad \frac{0.693}{\mu} \quad (2.2)$$

unde:

g – timpul de generare;

μ – rata specifică de creștere.

2.3.21. Determinarea lactozei

Pentru determinarea lactozei în lapte a fost utilizată stația de cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu detectare refractometrică formată din: instalația HPLC Agilent 1100 și Centrifuga OIHH-8 (Figura 2.3). Metoda se realizează conform procedurii descris în ISO 22662:2007 [77].

Pentru determinarea lactozei se utilizează faza limpede apoasă a laptelui de capră obținută după centrifugare. Procesul de obținere a fazei limpede apoasă se efectuează prin centrifugare pe o durată de 15 min. la 8000 rot/min și filtrare printr-o membrană de 0,45 μ m.



Fig. 2.3. Aparataj utilizat pentru determinarea conținutului de lactoză: a) Instalația HPLC Agilent 1100; b) Centrifuga OHH-8

Celula de referință a detectorului refractometric clătită de două ori cu eluent (850 ml de acetonitril și 150 ml de apă, degazat cu heliu) se lasă pe 15 min pentru stabilirea liniei de fond. Refractometrul se reglează la zero. Prin cartușul C18 de filtrare se trece în contrasens 10 ml de etanol, apoi 10 ml de apă demineralizată. Proba se trece prin cartușul C18 în felul următor: seringă de 10 ml se clătește cu 2 ml de probă, după care se trece 8 ml din proba de analiza, cartușul se unește cu capătul îngust al seringii și proba trece prin cartuș; primii 3 ml se elimină, următorii 5 ml se transferă în balon conic de 10 ml. Pentru reutilizare ulterioară, cartușul după filtrare se clătește cu 10 ml de etanol, apoi cu 10 ml de apă demineralizată. 1 ml soluție standard de lactoză, pregătită în prealabil cu concentrație de 2,0%, puritate >99% se introduce în dispozitivul de injectare. La momentul deplasării la 90° a manetei dispozitivului, pompa cuaternară include 10 μl de soluție în faza mobilă acetonitril cu apă pentru transfer în coloana cromatografică. Coloana de cromatografiere Zorbax Sax NH₂ se spală cu 50 ml de etanol, înainte de trecerea amestecului acetonitril cu apă în compoziție 85:15. Debitul inițial a fost de 0,1 ml/min., apoi a fost mărit progresiv până la 1,5 ml/min. Se observă separarea apei și a lactozei în dependență de timpul de reținere. Detectorul refractometric determină online valoarea suprafețelor picurilor apei și lactozei, apoi informația se transmite în baza de date a softului pentru analiză. Durata analizei a constituit 12 min. Respectiv 1 ml probă de analiză (faza limpede după centrifugarea laptelui) se supune analizei calitative și cantitative, în același mod ca și soluția standard. Procesarea datelor obținute se realizează conform următoarelor calcule:

a) calcul factorilor de răspuns a soluției standard de lactoză conform formulei 2.3:

$$RF_{st} = \frac{S_{st}}{C_{st}} \quad (2.3)$$

unde:

S_{st} – este suprafața picului componentului în soluția de calibrare;

C_{st} - concentrația componentului în soluția de calibrare.

b) calcul conținutului de lactoză în lapte de capră conform formulei 2.4:

$$C_{pr} = \frac{S_{pr}}{RF_{st}} \quad (2.4)$$

unde: S_{pr} - suprafața picului lactozei în proba de analizat. Rezultatele se exprime în %.

2.3.22. Asocierea tulpinilor pentru obținerea culturilor starter pentru brânză

Într-un pahar conic Erlenmeyer cu lapte degresat steril se adaugă 3 anse din asociația de lactococi mezofili și o ansă de tulpină termofilă. Paharul se plasează în incubator la temperatura $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Se monitorizează timpul de formare a coagulului. Peste 6 ore de la începutul incubării se verifică rata de creștere a microorganismelor prin examinare microscopică. Se selectează asociațiile care au coagulat laptele maximum în 7 ore și pe frotiul microscopic al cărora se observă dezvoltarea lactococilor și a streptococilor [169].

Cultura starter se prepară după schema prezentată în Figura 2.4.

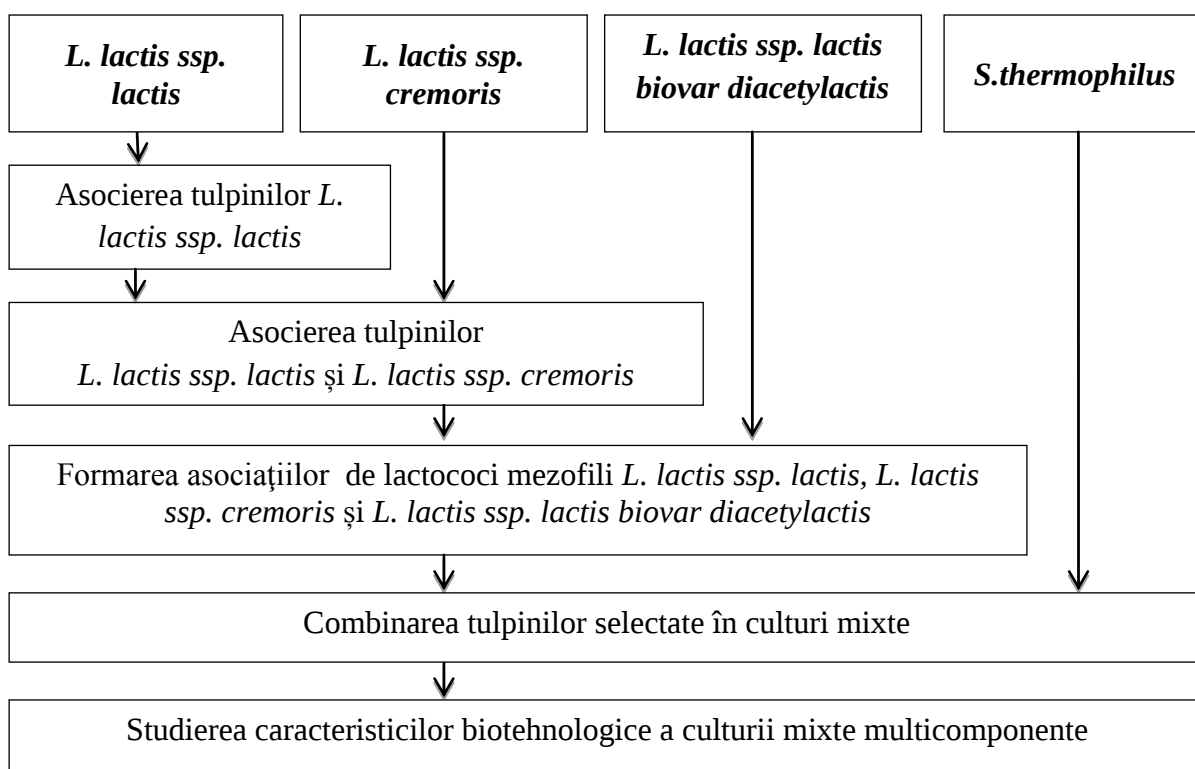


Fig. 2.4. Schema de obținere a culturii starter pentru brânză

2.3.23. Determinarea compatibilității tulpinilor în cultură

În laptele fiert cu temperatura optimă pentru cultivare a bacteriilor lactice se introduce 3% de cultură combinată. După obținerea coagulului, culturile se plasează pentru 1-2 ore la temperatura camerei, apoi la temperatura de 3-5°C timp de 16-18 ore. Compatibilitatea tulpinilor în cultură se determină prin timpul de formare a coagulului în comparație cu timpul de formare a coagulului către fiecare tulpină din cultură aparte. Sunt selectate culturile mixte, care formează coagul în perioada de timp comparabilă cu cea mai activă tulpină din asociație [169, p.86].

2.3.24. Determinarea caracteristicilor organoleptice ale culturilor starter

În laptele pasteurizat se adaugă 1-1,5% de cultură și se incubează la temperatura 30±1°C. După formarea coagulului dens laptele fermentat se răcește și se plasează în frigider la temperatura 4±2°C. A doua zi, prin degustare, sunt selectate culturile care au format coagul dens cu aromă de lapte curat și gust caracteristic [169, p.72].

2.3.25. Detectarea tulpinilor antagoniste

În lapte degresat steril (50 ml) se inoculează culturile cercetate (1-2 picături), incluse în cultura starter și se plasează la temperatura optimă de creștere timp de 48 h. Apoi, coagul se filtrează printr-un filtru de hârtie, filtratul se încălzește pe o baie de apă timp de 10 minute, după care se răcește rapid. Filtratul (1 ml) se adaugă în eprubete cu lapte degresat steril (10 ml) amestecat cu albastru de metilen. Apoi, în fiecare eprubetă se adaugă câte 8 picături din fiecare cultură cercetată, se amestecă și se plasează la temperatura optimă de creștere a culturii. Totodată, se prepară probele martor - în eprubete cu lapte degresat steril (10 ml) amestecat cu albastru de metilen se adaugă culturile separate și se plasează la temperatura optimă de creștere.

După 2 ore de incubare se observă reducerea albastrului de metilen. Dacă laptele inoculat cu filtratul (proba de testare) reduc albastru de metilen mai lent decât proba martor, înseamnă că filtratul conține substanțe antibiotice, iar cultura este antagonistă. Culturile starter care conțin culturi antagoniste sunt eliminate [119, p.191].

2.3.26. Determinarea stabilității culturilor starter

Pentru acest test culturile starter se cultivă la temperatura 30±2°C în lapte degresat steril peste fiecare 15 zile (3 pasaje). În eprubete cu lapte degresat steril se introduce 1% de cultură starter. Incubarea se face până la obținerea coagulului, dar nu mai mult de 7 ore. Păstrarea culturilor între reînsămânțări se efectuează la temperatura 3-5 °C. Apoi culturile bacteriene se

cultivă la temperatura $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ în lapte pasteurizat cu determinarea duratei de coagulare, caracteristicilor organoleptice și microscopia coagulului [169, p.26].

2.3.27. Metoda de determinare a proprietăților antagoniste ale bacteriilor lactice

Pentru determinarea proprietăților antagoniste ale bacteriilor lactice a fost utilizată metoda godeurilor [134]. 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. Pe mediul agarizat distribuit în plăci Petri și populat cu cultura de referință respectivă au fost sfredelite cu un sfredel steril godeuri cu diametrul 6-8 mm, care au fost înlocuite prin culturi de bacterii lactice studiate. Cutiile Petri au fost incubate timp de 24 ore la temperatura de 37°C . A fost determinat diametrul zonei de inhibiție a creșterii tulpinilor patogene de referință [169].

Diametrul zonelor de liză a celulelor în jurul godeurilor depinde de gradul sensibilității culturii de referință la antibiotice, conform gradației lui M. Birgher [124, 152]:

- Ø zonei ≤ 10 mm – sensibilitate scăzută;
- Ø zonei 11-15 mm – sensibilitatea medie;
- Ø zonei 15-25 mm – sensibile;
- Ø zonei ≥ 25 mm – sensibilitate sporită.

2.3.28. 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 cm^3 în două rânduri paralele de tuburi cu lapte degresat steril, efectuat în conformitate cu metoda indicată în standardul GOST 10444-88 și SM SR ISO 15214-14 [13, 31].

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 [15].

2.3.29. Determinarea numărului de microorganisme aerobe mezofile și facultativ anaerobe (NMMAFA)

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 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 48 ore [29].

În culturile pe medii nutritive dense, 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.

2.3.30. 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 reglementat pentru un anumit produs. Fiecare diluție (în triplicat) se introduce în eprubete cu mediu nutritiv pregătit conform standardului SM ISO 4831 și 4832 [27, 33]. Eprubetele se termostatează la $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 24 ± 2 ore. În caz 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.

2.3.31. Identificarea microorganismelor patogene, inclusiv *Salmonella*

Pentru detectarea unui număr mic de bacterii din genul *Salmonella*, este obligatorie îmbogățirea prealabilă a culturii. Conform Standardului SM EN ISO 6579, 25 g de produs supus analizei se încălzește până la $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ și se suspendă în apă peptonată tamponată, urmat de incubare la $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 18 ± 2 ore. Culturile incubate se însămânțează pe mediul agarizat și se termostatează la $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 24 ± 3 ore [28]. Coloniile suspectate a fi din genul *Salmonella* se identifică ulterior prin teste biochimice și serologice specifice.

2.3.32. Identificarea cantitativă a *Staphylococcus aureus*.

Toate mediile pentru identificarea *Staphylococcus aureus* se pregătesc conform metodelor indicate în Standardul SM SR EN ISO 6888-2 [32]. 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 de diagnostic selectiv agarizat se însămânțează cu inocul din eprubetele estimate ca pozitive după 24 de ore și din toate eprubetele după 48 ore. 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 colorația Gram, activitatea 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.

2.3.33. Procesul de liofilizare a bacteriilor lactice

Culturile de bacterii lactice selectate au fost păstrate folosind stația pilot a Laboratorului de Biotehnologii alimentare al IȘPHTA formată din: bioreactorul Biostat Sartorius A+, centrifuga cu răcire Rotina 38R și liofilizatorul LABCONCO Freeze Dry System (Figura 2.5).

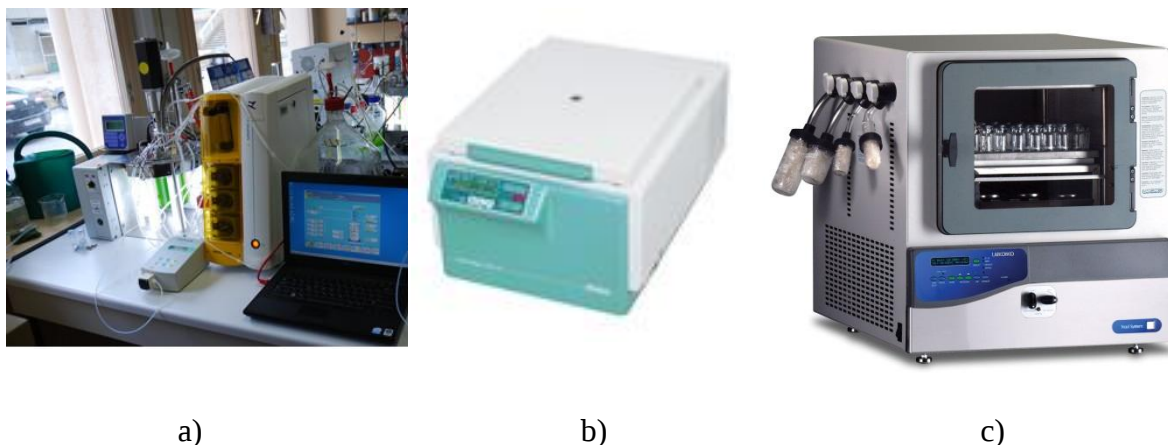


Fig. 2.5. Aparataj utilizat pentru cultivarea, concentrarea și liofilizarea bacteriilor lactice: a) Bioreactorul Biostat Sartorius A plus; b) Centrifuga cu răcire Rotina 38R; c) Liofilizatorul LABCONCO

Liofilizarea prezintă 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 [117]. Procesul de liofilizare se efectuează prin congelarea și uscarea suspensiei în vid la 57 Pa direct din stare congelată, evitând faza lichidă. În aceste condiții bacteriile se păstrează în stare de anabioză cu metabolism limitat.

Liofilizarea s-a efectuat la instalația de marca Labconco, conform procedurii elaborat în Laboratorul de Biotehnologii alimentare al IȘPHTA [56]. 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 mărit până la +27°C, pentru eliminarea maximală a umidității. Durata procesului de liofilizare - 20±2 ore.

2.3.34. Determinarea fracției masice de grăsime în substanța uscată

Determinarea fracției masice de grăsime în substanța uscată se efectuează conform SM EN ISO 1735 [25]. Se folosesc butiometre speciale pentru brânza. Se cântăresc 3 g de brânza, se mojară bine și se introduc în păharul butiometrului. După etanșarea acestuia, în partea inferioară se introduce acid sulfuric d=1,55 până la acoperire completă a păharului, se astupa cu dopul și se introduce în baia de apă la 70°C. Se agită, după 30 min în masa descompusă de brânză se introduce 1 ml alcool izoamilic și acid sulfuric până la acoperirea diviziunii 35 de pe tija butiometrului și se astupa cu dopul la partea superioară. Se amestecă și apoi se centrifughează 5 min la turația de 800-1200 rot/min. După centrifugare butiometrul se introduce în baia de apă timp de 5 min, apoi se citește procentul de grăsime direct pe tija gradată a butiometrului. Se calculează procentul de grăsime raportat la substanța uscată din brânză.

2.3.35. Determinarea fracției de umiditate

Determinarea fracției de umiditate în produs se efectuează conform SM EN ISO 5534 [30]. Se determină conținutul procentual al apei prin metoda uscării la etuvă. Pentru acest test se cântărește fiola din sticlă cu nisip calcinat, bagheta, capacul și 2 g de brânză, care se notează prin G 1, apoi se introduce în etuvă cu capacul așezat lângă fiolă timp de 30 min. la temperatura de 105 °C, după uscare și racire în exicator fiola cu capac, bagheta și brânza se recântărește și se notează cu G2. Calculul cantității de apă la 100 g de brânză se calculează prin formula 2.5:

$$\% \text{ apa} = \frac{G1 - G2}{G} \times 100 \quad (2.5)$$

unde:

G1 – greutatea fiolei cu brânză înainte de uscare;

G2 – greutatea fiolei cu brânză după uscare;

G - grame brânză luate în analiză (ex. 2 g).

2.3.36. Determinarea fracției masice de clorură de sodiu (NaCl)

Determinarea fracției masice de clorură de sodiu (NaCl) în produs se efectuează conform SM SR EN ISO 5943:2012 [24]. În paharul butiometrului cu capacitatea de 100 cm³ se adaugă

de la 2 g până la 5 g de produs, 30 cm³ de apă și 2-3 cm³ de acid azotic. Metoda constă în titrarea cu o soluție de azotat de argint, amestecarea și menținerea până la atingerea punctului final de titrare, care corespunde diferenței maxime de potențial observată între două adăugări consecutive de volume egale (0,05 cm³) dintr-o soluție standard de azotat de argint.

Fracțiunea de masă a clorurii de sodiu în %, se calculează prin formula 2.6:

$$X_{Cl} = \frac{(V_1 - V_0) \times \frac{c}{1000} \times M}{m} 100 \quad (2.6)$$

unde:

c - concentrația molară a soluției azotat de argint mol / dm³;

V_0 - volumul soluției azotat de argint utilizat în proba martor, cm³;

V_1 - volumul soluției azotat de argint utilizat în analiza produsului, cm³;

M - masa molară pentru exprimarea rezultatului sub forma unei fracții de masă de clor în procente;

m - masa probelor de analiza, g.

Rezultatul final al analizei este considerat ca media aritmetică a rezultatelor a două măsurări paralele.

2.3.37. Analiza de regresie

Analiza de regresie constă în identificarea relației matematice dintre variabile independente (ex. aciditatea activă și numărul de bacterii lactice viabile) și una variabilă dependentă (ex. durata de cultivare a tulpinii). Metoda se realizează cu scopul de a găsi modelul de regresie, care permite definirea unei erori, minimizarea acesteia și exprimă rezultatele experimentelor maximal corect.

- Construirea intervalului de încredere

Pentru a construi intervalul de încredere s-a utilizat cerințele stabilite în Standardul GOST 8.207 „Sistem de stat pentru asigurarea uniformității măsurărilor. 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 coincidenței distribuției experimentale cu cea teoretică” [15, 162].

Utilizând MO Excel a fost construite intervalele de încredere pentru estimarea parametrilor medii ai indicilor de aciditate activă a laptelui în timpul dezvoltării tulpinii (Tabelul 2.1).

Tabelul 2.1. Calculul intervalelor de încredere

Nr. d/o	Timp, ore	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis</i> CNMN-LB-73					
		Valorile acidității active, pH					
		x1	x2	xmed	x1-xmed	x2-xmed	
1	0	6,7	6,6	6,65	0,05	-0,05	
2	2	6,58	6,62	6,6	-0,02	0,02	
3	4	6,40	6,35	6,37	0,03	-0,02	
4	6	6,17	6,22	6,2	-0,03	0,02	
5	8	5,86	5,94	5,9	-0,04	0,04	
6	10	5,62	5,71	5,66	-0,04	0,05	
7	12	5,10	5,08	5,09	0,01	-0,01	
8	14	4,77	4,88	4,82	-0,05	0,06	
Valorile intervalelor de încredere și a variațiilor							
	(x1-xmed) ²	(x2-xmed) ²	Σ(xi-xmed) ²	Variation	Confidence	Conf 1	Conf 2
1	0,0025	0,0025	0,005	0,05	0,016794	6,633206	6,666794
2	0,0004	0,0004	0,0008	0,02	0,006718	6,593282	6,606718
3	0,0009	0,0004	0,0013	0,025495	0,008563	6,361437	6,378563
4	0,0009	0,0004	0,0013	0,025495	0,008563	6,191437	6,208563
5	0,0016	0,0016	0,0032	0,04	0,013435	5,886565	5,913435
6	0,0016	0,0025	0,0041	0,045277	0,015207	5,644793	5,675207
7	0,0001	0,0001	0,0002	0,01	0,003359	5,086641	5,093359
8	0,0025	0,0036	0,0061	0,055227	0,018549	4,801451	4,838549

- Determinarea punctelor staționare după modelul optimal

Pentru determinarea punctului de extremă (maximumul absolut) al unei funcții în regiunea cercetată, au fost construite curbele ce descriu cinetica dezvoltării tulpinilor studiate la începutului fazei logaritmice prin modelul polinomial de ordinul 2 (temperatura de cultivare 30±2°C).

În punctele analizate proximitatea modelului matematic de cel experimental ($R^2=1$ sau 0,99) se obține prin aproximarea datelor experimentale, utilizându-se ecuația polinomială de ordinul al doilea. Modelul optimal de ordinul al doilea (x^2) permite descrierea exactă a rezultatelor experimentelor efectuate.

Metodele de analiză matematică s-au folosit conform modelului optimal. Punctele critice permit determinarea valorilor maxime absolute ale funcției și au fost găsite prin construirea dependențelor experimentale (numărul de celule în timpul cultivării).

Extremele obținute conform modelului matematic coincid cu extremele obținute în cadrul experimentului, ceea ce confirmă un grad înalt al veridicității experimentul.

Evaluarea comparativă a extremelor modelelor dependenței de ordinul al doilea (2^2) este prezentată în Tabelul 2.2.

Tabelul 2.2. Tabelul rezumativ al extremelor pentru estimarea numărului de bacterii lactice cultivate la temperatură $30 \pm 2^\circ\text{C}$ (y).

Tulpina	Ecuția de regresie	Extremele obținute în urma experimentului		Extremele conform modelului matematic	
		x	y	x	y
CNMN-LB-73	$y = -0,0253x^2 + 0,7473x + 3,2583$	14,78	8,89	14,77	8,77
CNMN-LB-74	$y = -0,0221x^2 + 0,6435x + 4,1985$	14,31	8,92	14,56	8,88
CNMN-LB-75	$y = -0,0285x^2 + 0,7941x + 3,1202$	13,71	8,66	13,93	8,65
CNMN-LB-76	$y = -0,0237x^2 + 0,5796x + 4,7508$	11,69	8,30	12,23	8,29
CNMN-LB-77	$y = -0,0251x^2 + 0,6437x + 3,8808$	12,49	8,06	12,82	8,00
CNMN-LB-78	$y = -0,0236x^2 + 0,6299x + 4,5895$	13,29	8,75	13,34	8,79
CNMN-LB-79	$y = -0,0596x^2 + 1,3449x + 1,3035$	11,31	9,00	11,28	8,89

În rezultatul prelucrării matematice a datelor experimentale s-au determinat ecuațiile de regresie de ordinul doi, care descriu exact dependența acidității active și numărului de bacterii lactice de durata cultivării în mediul din lapte de capră.

2.3.38. Planificarea matematică a experiențelor de optimizare a mediului protector

Mediul de protecție pentru liofilizarea bacteriilor lactice a fost optimizat prin elaborarea a două modele matematice adecvate, fiind calculați indicii de viabilitate a tulpinilor liofilizate. Toate interacțiunile posibile între agenții de protecție au fost luați în considerare.

Planificarea matematică a experimentelor are ca sarcină elaborarea schemei în baza datelor obținute, unde se ține cont de toate combinațiile posibile între factorii de influență. Aceste date formează matricea-sistem a experimentului planificat.

Inițial, experimentul planificat necesită atribuirea factorilor de influență pentru două nivele de variație: superior x_{sup} și inferior x_{inf} . Aceste nivele se aleg la distanță egală de nivelul central x_0 al factorului de influență, desemnat ca nivel de bază sau punct zero, ce indică valoarea factorilor de influență în proximitatea cărora se efectuează modelarea experimentală. Intervalul limitat de valorile inferioare și superioare ale factorilor de influență descrie domeniul experimental. În acest interval de variație toți factorii de influență pot avea valori.

Pentru generalizarea matricelor-sistem și simplificarea modului de prezentare ale experimentelor derulate, coordonatele se transformă prin atribuirea nivelului superior al

factorului de influență a simbolului "+1", nivelului inferior - a simbolului "-1", iar punctului central respectiv simbolul „0”.

În forma codificată, matricea inițială a legăturii matematice stabilite între funcția de răspuns Y și factorii de influență X, are următoare formula 2.7:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i \neq j}^k b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \dots, \quad (2.7)$$

unde:

Y – funcția de răspuns;

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

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

k – nivelul superior al variabilei reale.

Variabilele reale se transformă în variabile codificate prin schimbarea unității de măsură și originii sistemului de axe de coordonate. Coeficienții b_i se calculează în baza datelor experimentale obținute în cadrul experimentului planificat, efectuat în ordine aleatoare (randomizată). Ordinea de efectuare a experiențelor se alege în baza tabelului datelor cu distribuție probabilistică. Matricea sistem este determinată de tabelul structurat al nivelelor factorilor, având valori pentru factorii x_i . Matricea sistem a experiențelor de optimizare a mediului de protecție pentru bacteriile lactice cercetate este prezentată în Tabelul 2.3.

Tabelul 2.3. Matricea-sistem a experiențelor pentru optimizarea mediului protector

Nr. crt.	Cantitatea în mediul protector, %		Forma codificată		Y1	Y2	Y _{med}
	x1	x2	x1	x2			
	lapte degresat de capră	citrat de sodiu					
1	70	1	-1	-1	69,8	70,2	70
2	80	1	1	-1	77,4	77	77,2
3	70	2	-1	1	72,3	72,7	72,5
4	80	2	1	1	81	80,6	80,8
5	75	1,5	0	0	76	76	76
6	80	1,5	1	0	79,2	79,8	79,5
7	70	1,5	-1	0	72	72,4	72,2
8	75	2	0	1	77	77	77
9	75	1,5	0	-1	74,2	73,8	74

*Nota: *conform analizei ANOVA media rezultatelor variabilei dependente (n=2) este statistic veridică la nivelul de semnificație global 0,05 cu un nivel de încredere de 95%.*

Matricea respectivă a stat la baza realizării experimentului cu doi factori de influență și au fost obținute rezultate care au determinat calculul ecuației de regresie de ordinul doi, ce

descrie veridic ($p < 0,05$) modificarea viabilității bacteriilor lactice în dependență de conținutul substanțelor în mediul de protecție.

2.3.39. Analiza statistică a datelor

a. Prelucrarea statistică a datelor privind rezultatele a 2-5 repetări obținute s-a efectuat prin calcularea următorilor parametri [133]:

- Selectarea datelor și calculul mediei se calculează conform formulei 2.8:

$$M = \frac{\sum_{i=1}^n}{n}, \quad (2.8)$$

unde:

x – valoarea individuală a măsurării;

n – numărul variantelor caracteristicii statistice.

- Calculul variației eșantionului și deviația standard a unui eșantion se calculează conform formulei 2.9 și 2.10:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - M)^2}{n-1} \quad (2.9)$$

$$S = \sqrt{S^2} \quad (2.10)$$

- Calcularea intervalului de încredere pentru o medie se calculează conform formulei 2.11:

$$(M - t_{\alpha, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}; M + t_{\alpha, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}) \quad (2.11)$$

unde: $t_{\alpha, n-1}$ – coef. Student, t-distribuție;

b. Prelucrarea matematică a datelor experimentale conform matricelor experimentelor planificate de tip 2² a fost efectuată cu ajutorul programului *MO Excel*, interpretarea grafică a rezultatelor a fost efectuată cu ajutorul *Advanced Grapher 2.2*.

2.4 Concluzii la capitolul 2

1. În calitate de obiecte de studiu în această lucrare au fost utilizate tulpini autohtone de *L. lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*, *L. lactis ssp. cremoris* și *S. thermophilus* izolate din lapte de capră crud. Utilizarea tulpinilor autohtone de bacterii lactice izolate dintr-o sursă naturală locală – laptele de capră oferă rezultatelor o valoare practică mai pronunțată în aspect geografic zonal.
2. Utilizarea culturilor tip de referință din diverse colecții de microorganisme au permis evidențierea activității antagoniste față de agenții patogeni a tulpinilor de bacterii lactice studiate.
3. Metodele clasice și moderne, echipamentele și mediile nutritive utilizate în studiu asigură atât identificarea tulpinilor noi autohtone de *L. lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*, *L. lactis ssp. cremoris* și *S. thermophilus*, cât și descrierea proprietăților tehnologice valoroase ale culturilor starter și produselor lactate fermentate obținute prin utilizarea lor.

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

Un rol important în fabricarea produselor lactate fermentate îl au microorganismele prezente în materia primă, laptele crud fiind un mediu favorabil de izolare a bacteriilor lactice cu proprietăți biotehnologice importante pentru industria alimentară [8, 16]. În baza utilizării bacteriilor lactice s-au creat și se dezvoltă ramuri importante ale industriei produselor alimentare.

Obținerea produselor lactate la scară industrială depinde de calitatea culturilor starter cu caracteristici specifice, utilizate în procesul biotehnologic. Selectarea tulpinilor bacteriene din componența culturilor starter are loc în dependență de tipul produselor lactate, în baza următoarelor criterii: caracteristicile organoleptice, activitatea antagonistă față de microorganismele condiționat patogene, activitatea de coagulare a laptelui, sinereza, numărul de bacterii lactice viabile în produs.

Însă, culturile starter sunt elaborate de regula pentru laptele de vacă și nu sunt optime pentru laptele altor specii. Utilizarea culturilor specifice selectate din lapte de capră are importanță esențială în desfășurarea procesului tehnologic de fabricare a produselor lactate cu însușiri noi, siguranță și calitate garantată. Astfel, o varietate mare de produse lactate sunt obținute datorită utilizării culturilor starter specifice, compuse din diferite tipuri de bacterii lactice [112].

Sunt cunoscute diverse procedee tehnologice de procesare a laptelui de capră pentru obținerea iaurtului și băuturilor lactate, cu utilizarea culturilor starter de bacterii lactice din genurile *Lactococcus* - *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* și *Bifidobacterium* [60, 79, 81, 90, 113].

Culturile utilizate în acest caz diferă de culturile starter destinate fabricării brânzeturilor, în special din lapte de capră, fiind axate pe obținerea unor proprietăți specifice fiecărui tip de produs (umiditate, textură, proprietăți structurale).

Streptococii termofili și lactococii mezofili sunt cele mai utilizate culturi bacteriene pentru fabricarea produselor lactate fermentate la scară industrială [150]. Capacitatea acestor bacterii de a se asocia în culturi mixte contribuie la diversificarea culturilor starter de bacterii lactice, a materiei prime și la obținerea unor produse calitative din lapte de capră.

Mulți autori au demonstrat varietatea bacteriilor lactice izolate din lapte de capră și potențialul lor biotehnologic sporit, proprietățile cărora au contribuit la valorificarea lor ulterioară în compoziția culturilor starter de valoare comercială.

În ultimul timp, în Republica Moldova a crescut interesul față de procesarea laptelui de capră, de aceea apare necesitatea în tulpini autohtone de bacterii lactice special destinate fabricării produselor din lapte de capră. Până în prezent tendință de aplicare a culturilor starter autohtone se manifestă insuficient, exprimându-se prin utilizarea în industria laptelui a culturilor starter de import. Aceste culturi nu au efectul tehnologic așteptat deoarece nu sunt adaptate la materia prima autohtonă și condițiile de producere ale întreprinderilor din țară, dar cheltuielile legate de import contribuie la majorarea prețului produsului finit.

Mulți specialiști din industria laptelui recunosc necesitatea și importanța soluționării acestei probleme, care poate fi atinsă prin utilizarea tulpinilor autohtone de bacterii lactice în scopul eficientizării tehnologiilor de preparare a produselor lactate fermentate.

Astfel, la prima etapă a cercetărilor ne-am propus selectarea unor tulpini de bacterii lactice din lapte de capră în scopul utilizării lor la prepararea culturii starter mixte (simbiotice) autohtone pentru fabricarea brânzei.

Cercetările la acest capitol au fost realizate conform următoarelor etape:

1. Izolarea culturilor pure de bacterii lactice;
2. Descrierea însușirilor culturale și morfologice ale tulpinilor izolate;
3. Descrierea însușirilor fiziologice și biochimice ale tulpinilor de bacterii lactice izolate;
4. Descrierea proprietăților tehnologice ale tulpinilor autohtone selectate;
5. Determinarea parametrilor biotehnologici optimi pentru culturile de bacterii lactice;
6. Modificarea mediului nutritiv pentru cultivarea bacteriilor lactice izolate din laptele de capră.
7. Optimizarea mediului de protecție pentru liofilizarea tulpinilor de bacterii lactice selectate.

3.1 Izolarea culturilor pure de bacterii lactice

Bacteriile lactice pot fi izolate din diferite surse: produse lactate artisanale, părți de plante, în special flori și fructe, suprafața legumelor și fructelor. Prin selectarea direcționată de microorganisme, precum și utilizarea unor tehnici speciale de izolare, pot fi preparate tulpini bacteriene care posedă proprietăți biotehnologice complexe. Astfel, în ultimul timp a crescut interesul cercetătorilor față de bacteriile lactice izolate din laptele de capră crud, care posedă un potențial biotehnologic sporit pentru industria laptelui [88, 90, 96].

Izolarea bacteriilor lactice include o serie de etape, din care fac parte prelevarea probelor, însămânțarea pe mediu nutritiv lichid și solid, izolarea culturii pure, studierea proprietăților

morfo-culturale și fiziologo-biochimice ale tulpinilor izolate, identificarea acestora și determinarea proprietăților lor tehnologice valoroase pentru industria laptelui [179].

Realizarea eficientă a tuturor etapelor de izolare și identificare a tulpinilor de microorganisme lactice este actuală în scopul utilizării lor ulterioare în compoziția culturilor starter pentru fabricarea produselor lactate. Pentru selectarea și identificarea tulpinilor cu activitate biochimică pronunțată s-a efectuat testul inițial principal privind determinarea capacității bacteriilor lactice de a fermenta laptele.

Pentru izolarea culturilor pure de bacterii lactice au fost prelevate probe de lapte crud de capră din 12 regiuni ale Republicii Moldova: Briceni, Dondușeni, Soroca, Bălți, Florești, Ungheni, Orhei, Chișinău, Anenii Noi, Taraclia, Comrat, Cahul. Culturile s-au incubat la temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ și 40°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 efectuată zilnic (nu mai puțin de 10 ori) conținutul eprubetelor a fost testat pentru puritatea culturii prin examenul microscopic al frotiului.

Au fost studiate circa 150 probe de lapte crud de capră, din care au fost obținute 7 izolate bacteriene cu proprietăți stabile caracteristice subspeciilor *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* și *Streptococcus thermophilus*. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 3.1.

Tabelul 3.1. Originea tulpinilor studiate

Nr.crt.	Originea	Codul tulpinii
1	r. Florești	L 14
2	r. Orhei	L 27
3		L 61
4	r. Taraclia	L 56
5	r. Anenii Noi	L 46
6		L 77
7	r. Ungheni	L 42



Pentru obținerea unei caracteristici cât mai complete a fiecărei tulpini noi de microorganisme este necesară efectuarea studiilor ținând cont de faptul că un taxon poate fi atribuit unui organism 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).

Identificarea microorganismelor se bazează pe determinarea trăsăturilor fenotipice: morfologice, culturale, fiziologice și biochimice, care permit identificarea relativ rapidă a tulpinilor de microorganisme izolate [145].

3.2 Caracteristicile morfo-culturale și fiziologo-biochimice ale tulpinilor autohtone

Determinarea inițială a morfologiei și a tipului de creștere a microorganismelor pe medii nutritive este foarte importantă și poate fi efectuată pe medii nutritive uzuale și pentru care există descrieri standardizate. Orice proprietăți esențiale ale bacteriilor lactice sunt importante pentru identificarea lor, iar determinarea particularităților de creștere în medii lichide oferă o estimare preliminară a tipului de metabolizare a substratului [126].

Pentru cultivarea cu succes a unui microorganism, mediile nutritive, prin proprietățile lor, ar trebui să fie apropiate de habitatul său natural. Laptele este un mediu nutritiv complet și favorabil pentru determinarea particularităților culturale ale bacteriilor lactice. În scopul cercetării caracterelor culturale și morfologice ale tulpinilor autohtone de bacterii lactice se utilizează mediul solid - lapte hidrolizat agarizat [119, 169, 172].

Pentru dezvoltarea lactococilor o mare importanță au condițiile specifice de cultivare, care permit evidențierea prealabilă a coloniilor tipice. Culturile de *L. lactis ssp. lactis* și *L. lactis ssp. cremoris* după termostatare au fost expuse la temperatura de cameră timp de 2 - 3 zile. În aceste condiții se evidențiază colonii de culoare galben deschisă cu structură omogenă, care sunt caracteristice pentru subspecia *Lactococcus lactis subsp. lactis* și colonii de culoare galben închis cu structură granulată caracteristică pentru subspecia *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

Tulpinile de *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*, care se întâlnesc relativ rar în habitatul natural, au fost cultivate pe mediul agarizat cu citrat de calciu, zaharoză și autolizat de drojdii. După expunerea timp de 1 - 2 zile la temperatura camerei s-au evidențiat colonii cu margini neregulate cu formațiuni fibroase caracteristice pentru subspecia heterofermentativă *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* [119].

Examenul proprietăților culturale include determinarea următorilor parametri: diametrul coloniei, forma (circulară, neregulată, lenticulară etc.), caracterul marginii (netedă, ondulată etc.), suprafața (plată, convexă, bombată, acuminată etc.), culoarea (albă, galbenă, crem); structura (omogenă, heterogenă, granulată etc.) și consistența (păstoasă, untoasă, uscată etc.).

Aspectul coloniilor de bacterii lactice izolate în viziune reală și mărită este ilustrat în Figura 3.1.

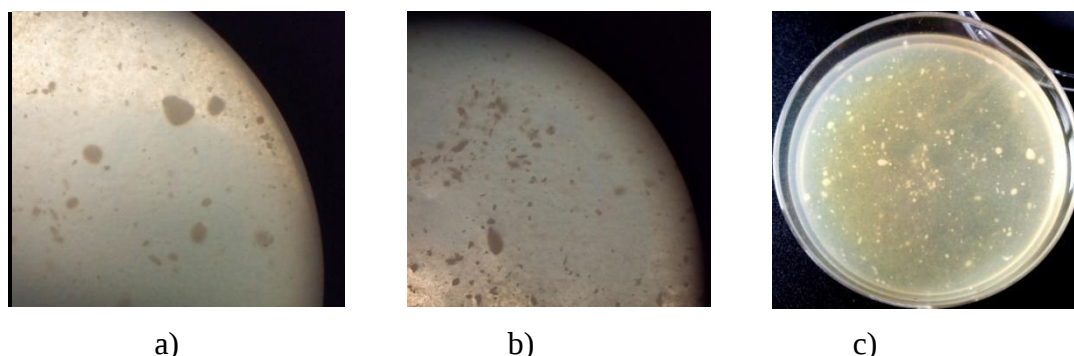


Fig. 3.1. Aspectul coloniilor de bacterii lactice: a), b) – colonie mărită de 6 ori, c) – aspect general al culturii pe mediul agarizat de lapte hidrolizat

(Autor foto Bogdan N.).

Din figura 3.1 putem observa, că tulpinile selectate, la cultivare pe mediu agarizat de lapte hidrolizat 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 [101].

Evaluarea morfologiei bacteriilor este o etapă foarte importantă pentru identificarea finală. Studiarea proprietăților morfologice ale bacteriilor se bazează pe aprecierea microscopică detaliată a preparatelor colorate și fixate.

La determinarea proprietăților morfologice ale bacteriilor lactice, au fost studiați următorii parametri: forma și localizarea celulelor, mobilitatea acestora, dimensiunea, culoarea caracteristică la colorația Gram.

Rezultatele microscopiei cu obiectiv cu imersie (puterea de mărire 100x) sunt reprezentate în Figura 3.2.

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.

Se cunoaște, că în zona climaterică a Republicii Moldova bacteriile termofile sunt mai puțin răspândite decât în regiunile sudice (balcanice, caucaziene, asiatice) [11].

De asemenea este cunoscut faptul că tulpinile de *Lactococcus lactis subsp. lactis* sunt izolate mai des din laptele crud, iar cele de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* rar pot fi detectate

și izolate din laptele crud și numai în perioada primăvară-vară, de aceea este necesar de a efectua cercetări în diferite perioade ale anului [39].

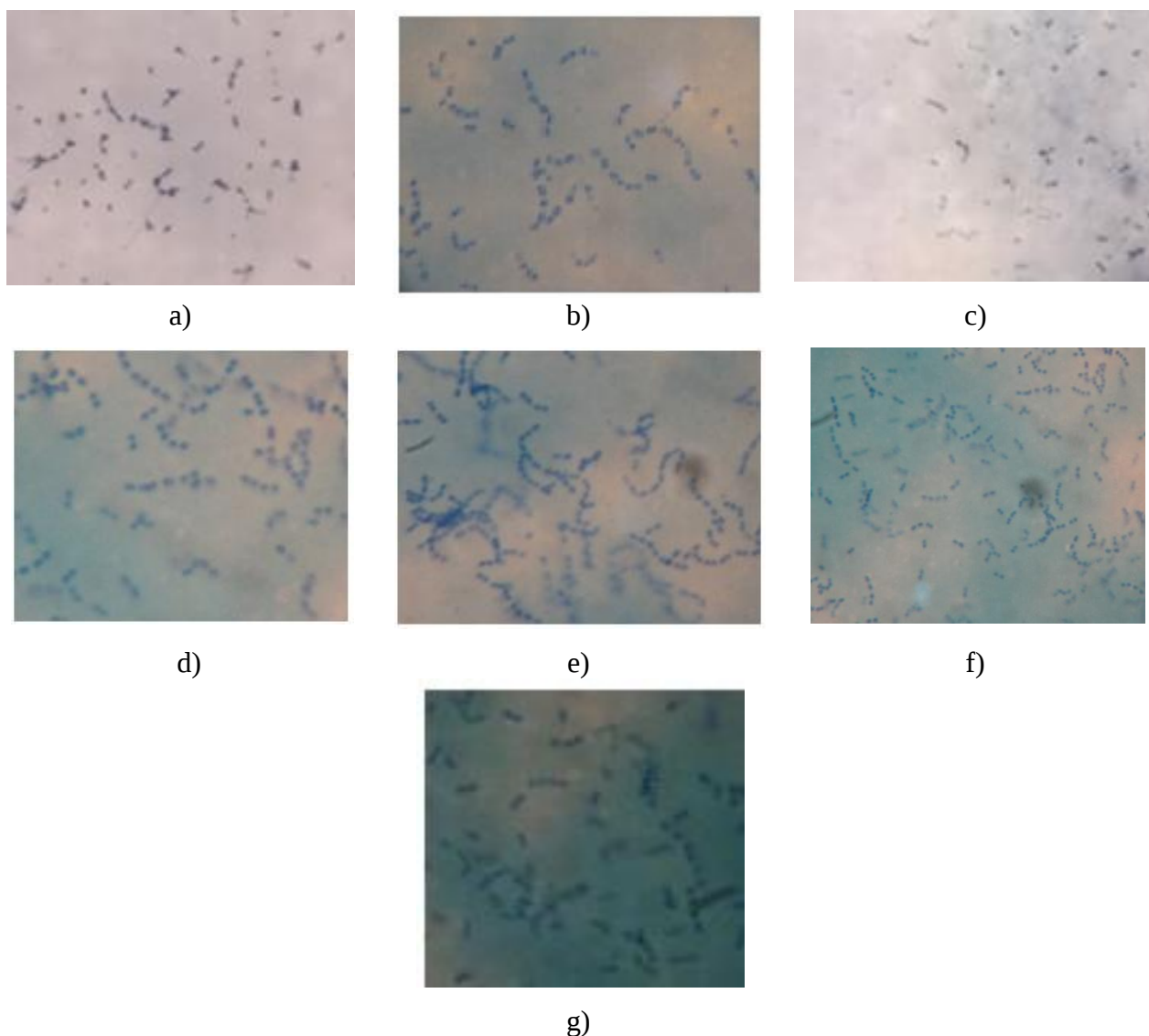


Fig. 3.2. Aspectul microscopic al tulpinilor:
a) L14, b) L27, c) L42, d) L46, e) L56, f) L61, g) L77
 (Autor foto Bogdan N.)

Pentru identificarea corectă a culturilor bacteriene este necesară evaluarea mai multor caracteristici și proprietăți - culturale, morfologice, fiziologice și biochimice. Studiul culturilor identificate anterior pe baza proprietăților morfologice și culturale a continuat cu determinarea caracteristicilor fiziologice și biochimice.

În pofida compoziției chimice comune, bacteriile diferă semnificativ în ceea ce privește proprietățile lor biochimice - capacitatea de a descompune substanțele nutritive, de a produce

antibiotice, vitamine, enzime, de eliberare a diferitor gaze în procesul activității vitale. Studiul proprietăților biochimice ale culturilor bacteriene face posibilă identificarea lor ulterioară prin intermediul unor medii nutritive speciale, pentru a stabili afilierea specifică și a le separa în tulpini. Acest lucru este valabil mai ales pentru bacteriile lactice, culturile pure fiind folosite pe scară largă în industria alimentară [119, 172].

Producția brânzeturilor naturale se bazează pe transformările biochimice ale părților componente ale masei brânzei, care au loc sub influența enzimatică a cheagului și a enzimelor bacteriilor lactice. Prin urmare, la selectarea tulpinilor pentru cultura starter destinată fabricării brânzeturilor, este necesară studierea proprietăților fizice și biochimice individuale [132].

Studierea proprietăților morfo-culturale permit de a identifica ușor bacteriile lactice mezofile și termofile, în timp ce studierea proprietăților fiziologo-biochimice permit atât identificarea completă până la gen a familiei bacteriene, cât și delimitarea bacteriilor mezofile/termofile de alte tipuri de microorganisme, deseori nedorite pentru utilizarea industrială.

Testul de coagulare/reducere a laptelui turnesolat prezintă un parametru important în studierea proprietăților fiziologo-biochimice, ce deosebește culturile de bacterii lactice termofile de cele mezofile. Rezultatele testului sunt vizibile în imaginea prezentată în Figura 3.3.

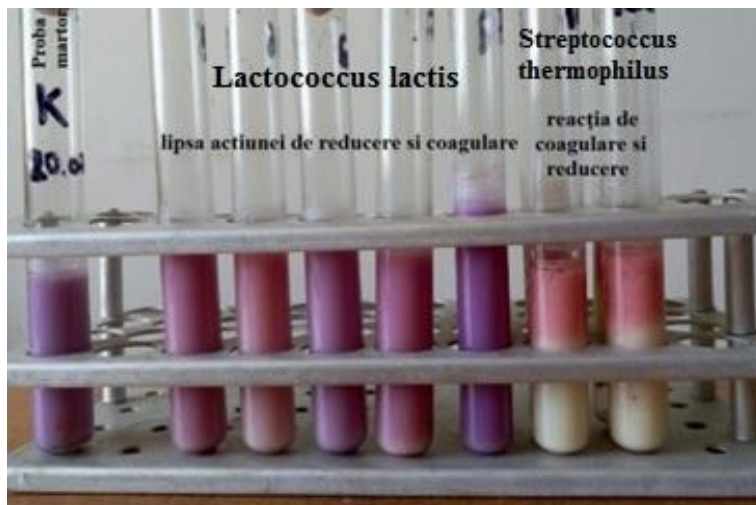


Fig. 3.3. Testul de coagulare/reducere a laptelui turnesolat la temperatura de 45°C

(Autor foto Bogdan N.)

Culoarea roz, vizibilă în figura 3.3 diferențiază culturile mezofile și termofile la temperatura de 45°C.

În randul bacteriilor lactice termofile se atestă o asemănare a speciilor din genul *Streptococcus* cu specia *Enterococcus faecalis*, ce poate fi depistată în laptele crud, fiind lipsită de statut GRAS (General Recognized As Safe) pentru utilizare în producere. În plus, enterococii

sunt capabili de a forma compuși nedorți, 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 [111].

Bacteriile lactice din genul *Enterococcus* sunt mai rezistente la temperaturi ridicate și sunt capabile să crească la o temperatură de incubare mai mare decât cele din genul *Streptococcus*, de aceea 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 dezvoltare în mediul cu bilă și cu 6%NaCl – proprietăți de care nu dispun streptococii lactici [126].

Bacteriile lactice se caracterizează prin activitate de acidogeneză intensivă, aspect important la elaborarea culturilor starter noi. Dar în același timp, activitatea de acidogeneză este parametrul prin care bacteriile lactice se deosebesc între ele.

Tulpinile mezofile din specia *L. lactis ssp. lactis* fermentează galactoza, glucoza, maltoza, dextrina și lactoza, nu fermentează arabinoza, xiloza, zaharoza, salicina, inulina, glicerolul, sorbitolul. Tulpinile din specia *L. lactis ssp.cremoris* au activitate de acidogeneză mai slabă în comparație cu *Lactococcus lactis ssp. lactis*, nu fermentează dextrina și maltoza. La fermentarea carbohidraților *L. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* este asemănător cu *L. lactis ssp. lactis*, numai că nu fermentează dextrina, dar au activitate acidifiantă cu mult mai slabă decât *Lactococcus lactis ssp. lactis* și *Lactococcus lactis ssp.cremoris*.

Tulpinile din specia *S. thermophilus* diferă de lactococi prin activitatea zaharolitică relativ slabă - fermentează numai lactoza, glucoza, zaharoza și nu fermentează maltoza, manoza, manitolul, sorbitolul, xiloza, galactoza și alți carbohidrați. Spre deosebire de streptococii termofili, enterococii fermentează manitolul, arabinoza, manoza, dextrina, galactoza, maltoza.

Astfel, au fost studiate proprietățile fiziologo-biochimice ale tulpinilor autohtone de bacterii lactice mezofile și termofile, respectiv abilitatea lor de a fermenta o serie de carbohidrați. Principalele însușiri fiziologo-biochimice ale tulpinilor studiate: rezultatul colorației Gram, producerea de CO₂ din glucoză, producerea catalazei, producerea amoniacului din arginină, rezistența la temperaturi mari, creșterea în mediul salin, alcalin, și în mediul cu bilă, creșterea în mediul cu albastru de metilen, capacitatea de a forma diacetil din citrați - sunt prezentate în Tabelul 3.2.

Datele din tabelul 3.2 indică asupra faptului că tulpinile de microorganisme testate sunt Gram pozitive, catalază negative, rezistă la temperatura de 60°C timp de 30 min. Culturile nu cresc pe mediul de 6,5% NaCl, dar toate se dezvoltă la concentrația de 2 % clorură de sodiu.

Tulpinile L27 și L46 nu cresc pe mediul cu 4%NaCl, ceea ce corespunde parametrilor fiziologo-biochimici caracteristici speciei mezofile *L. lactis ssp.cremoris*. În mediul alcalin cu pH 9,6 tulpinile nu au manifestat creștere. Toate tulpinile mezofile sunt rezistente la 0,1% albastru de metilen și mediu cu bilă de 20 % și 40 %, în afară de tulpina L56 - ceea ce este caracteristic pentru o tulpină din specia de *S. thermophilus*.

Tabelul 3.2. Proprietățile fiziologo-biochimice ale tulpinilor de bacterii lactice izolate din lapte de capră

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, 0,1%	Rezistența la bilă, %		Creșterea în mediul alcalin, pH	Formarea diacetilului
						2,0	4,0		20,0	40,0	9,2	
L14	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L27	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
L42	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L46	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
L56	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
L61	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L77	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

NOTĂ: + reacție pozitivă; - reacție negativă

Înșușirile descrise pentru tulpinile de bacterii lactice izolate corespund parametrilor fiziologo-biochimici caracteristici speciilor *L. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*, *L. lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp.cremoris* și *S. thermophilus* și indică necesitatea continuării testelor de identificare a proprietăților de fermentare a carbohidraților [45, 101, 125].

Etapă crucială la identificarea bacteriilor lactice prezintă determinarea capacității de fermentare a diferitor carbohidrați cu eliminarea acidului sau/și a gazului, ținând cont de faptul că fiecare tulpină asimilează un număr limitat și specific de surse de carbon [119].

Rezultatele cercetărilor efectuate sunt prezentate în Tabelul 3.3, de unde putem observa că toate tulpinile fermentează lactoza și glucoza. Tulpinile din specia *Lactococcus* au fermentat galactoza și manitolul, ceea ce nu este caracteristic pentru tulpina din specia *S. thermophilus* L56. De asemenea, tulpina *S. thermophilus* L56 nu a fermentat esculina și maltoza, care provoacă hemoliza, ceea ce reprezintă un argument că tulpină termofilă studiată nu are proprietăți fiziologice comune cu enterococii [172].

Tabelul 3.3. Fermentarea carbohidraților de către tulpinile de bacterii lactice izolate din lapte de capră

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

NOTĂ: + fermentează; - nu fermentează

Studiul proprietăților morfologice, culturale, fiziologice și biochimice ale culturilor noi izolate din lapte crud de capră a permis de a stabili subspeciile din cadrul speciei *Lactococcus lactis*: subspecia *lactis*, căreia îi corespund 3 tulpini cu numerele 14, 42, 77; subspecia *lactis* biovar *diacetylactis*, căreia îi corespunde tulpina cu numărul 61; subspecia *cremoris*, căreia îi corespund 2 tulpini cu numerele 27, 46. De asemenea, tulpina nr. 56 a manifestat caracteristicile corespunzătoare bacteriilor lactice din specia *Streptococcus thermophilus*.

În studiul prezent, cea mai mare parte a izolatelor de *Lactococcus* reprezintă *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, urmată de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Aceste rezultate confirmă datele descrise de alți autori care au depistat că din probele de lapte crud mai frecvent izolat este *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, în timp ce fenotipul *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, care tradițional este prezent în culturile industriale, a fost rar izolat [100, 39].

Diversitatea bacteriilor lactice izolate din lapte crud poate fi explicată prin faptul că au fost colectate probe din diferite zone și varietăți ale diferitor rase de caprine. Astfel, această diversitate este relativă și dependentă de natura materialului izolat și de diferite criterii utilizate în fiecare studiu aparte, conform rezultatelor raportate de Fitzsimmons, N. et al. (1999) [64] și, respectiv Bissonnette, F. et al. (2000) [40]. Alți autori consideră, că diversitatea microflorei lactice depinde de perioada anului, laptele de primăvară fiind mai sărac din punct de vedere nutritiv și conținând diferite substanțe, care stopează dezvoltarea bacteriilor lactice. În astfel de mediu se pot dezvolta numai forme rezistente de bacterii lactice [38, 58, 110, 114]. Dar autorul Bannikova, L. (1975) [119] consideră, că cea mai favorabilă perioadă pentru izolarea bacteriilor lactice este a doua jumătate a lunii mai și până în august, când laptele este mai favorabil ca

mediu pentru dezvoltarea bacteriilor lactice și se poate izola o cantitate maximală de bacterii lactice cu proprietăți funcționale importante.

Pe parcursul cercetărilor efectuate în această lucrare, din 150 probe de lapte crud de capră, au fost studiate circa 300 de izolate bacteriene, dintre care numai 7 tulpini au manifestat proprietăți caracteristice speciilor *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* și *Streptococcus thermophilus* [44, 45, 101, 125].

3.3 Proprietățile tehnologice ale tulpinilor autohtone de bacterii lactice

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

Principalii indici ce determină utilitatea industrială a tulpinilor includ: activitatea fermentativă a bacteriilor, acumularea acidului lactic, proprietățile organoleptice, viabilitatea culturii și, bineînțeles, o activitate antagonistă împotriva microflorei patogene. Paralel se determină și unele particularități specifice pentru fabricarea anumitor sortimente de produse [12, 100, 172]. Proprietățile tehnologice ale bacteriilor lactice utilizate în compoziția culturii starter determină proprietățile funcționale și de calitate ale produsului finit [5, 135].

Activitatea fermentativă a tulpinilor de bacterii lactice se apreciază prin viteza de coagulare a laptelui și prezintă cel mai important parametru tehnologic de apreciere a tulpinilor pentru utilizarea lor în producere, și un factor inhibitor pentru microorganisme dăunătoare din lapte. Conform metodelor și instrucțiunii recomandate [119, 172] procesul de obținere și selecție a culturilor pure de bacterii lactice se efectuează în mediu lichid de lapte degresat de vacă. Și deoarece culturile sunt selectate din lapte de capră, activitatea fermentativă a tulpinilor a fost evaluată comparativ pe aceste 2 medii.

Rezultatele obținute privind determinarea vitezei de fermentare a laptelui de capră comparativ cu cel de vacă de către tulpinile studiate sunt prezentate în Tabelul 3.4.

Analiza datelor din tabelul 3.4 demonstrează, că toate tulpinile autohtone de bacterii lactice au manifestat o viteză de acidulare a laptelui de capră mai înaltă decât a laptelui de vacă 4,4-7,7 ore și 4,6-9,3 ore respectiv. S-a stabilit că, tulpinile corespund cerințelor pentru bacteriile lactice mezofile și termofile, conform cărora activitatea fermentativă a tulpinilor de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* nu trebuie să depășească 7 ore, pentru *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* - 17 ore, pentru *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* - 8 ore și pentru *Streptococcus thermophilus* - 6 ore.

Tabelul 3.4. Viteza de fermentare a laptelui de către tulpinile în studiu

Codul tulpinii	Durata de coagulare, ore	
	în lapte de vacă	în lapte de capră
L14	6,1±0,2	5,2±0,1
L27	6,5±0,1	6,0±0,1
L42	6,5±0,3	5,3±0,2
L46	6,0±0,1	5,1±0,2
L56	4,6±0,2	4,4±0,3
L61	9,3±0,1	7,5±0,4
L77	6,5±0,2	5,5±0,1

Diferențele observate la diferite tulpini de bacterii lactice au fost explicate prin aceea că, viteza de fermentare depinde de capacitatea specifică a fiecărei tulpini de a descompune substanțele din mediu și de a le face capabile de asimilare. De aceea, în unele cazuri diferențele se datorează prezenței sau absenței sistemelor de transport al nutrienților [58].

De asemenea, tulpinile izolate au fost testate privind *capacitatea de a forma coagul* în lapte. Tulpinile studiate au fost capabile să se dezvolte și să formeze coagulul omogen cu consistență densă, cu gust curat de lapte fermentat la temperatura de incubare de 30°C. Caracteristica dată indică adaptarea înaltă a bacteriilor la tipul de materie primă, precum și la compatibilitatea lor în relații simbiotice și perspectiva utilizării lor în compoziția culturilor starter mixte [6].

În prezent, dezvoltarea biotehnologiei microbiene se concentrează pe furnizarea de bacteriile lactice noi de perspectivă pentru obținerea unui produs de calitate superioară. În acest scop, se identifică culturile pure de microorganisme cu proprietăți organoleptice ameliorate și un efect pozitiv asupra sănătății umane. Un indice calitativ important este determinarea intensității dezvoltării bacteriilor lactice prin acumularea acidului lactic și numărului de microorganisme [136]. Rezultatele obținute privind evoluția acestor parametri în timp sunt prezentate în Tabelul 3.5.

Tabelul 3.5. Acumularea acidului lactic sub acțiunea tulpinilor studiate și numărul de microorganisme într-un 1 ml de lapte fermentat

Codul tulpinii	Aciditatea titrabilă, °T		log UFC în 1 ml	
	în lapte de vacă	în lapte de capră	în lapte de vacă	în lapte de capră
L14	85,3±0,9	78,1±0,6	10 ⁹	10 ¹⁰
L27	89,1±2,0	85,7±0,4	10 ⁷	10 ⁷
L42	79,1±0,3	74,2±1,8	10 ⁹	10 ¹⁰
L46	78,2±0,5	72,2±1,0	10 ⁹	10 ¹⁰
L56	75,0±0,6	70,6±1,2	10 ⁹	10 ¹⁰
L61	75,2±1,7	68,7±2,0	10 ⁸	10 ⁹
L77	98,1±1,5	93,3±0,7	10 ⁸	10 ⁸

Aciditatea titrabilă prezintă un criteriu de evaluare a calității laptelui fermentat, iar capacitatea de formare a acidului este un criteriu pentru selectarea tulpinilor utilizate la fabricarea anumitor tipuri de produse lactate fermentate.

Analiza datelor din tabelul 3.5 demonstrează, că acumularea acidului lactic a fost mai rapidă în laptele de vacă, în timp ce dezvoltarea bacteriilor lactice a avut loc mai intens în laptele de capră, ceea ce indică, ca bacteriile lactice izolate din laptele de capră se dezvoltă mai intens și își păstrează viabilitatea în habitatul lor natural mai bogat în substanțe nutritive, de ex. oligozaharide [71, 114].

Numărul de microorganisme UFC în 1 ml de lapte fermentat a fost determinat prin diluții zecimale. Cel mai înalt titru de microorganisme viabile a fost înregistrat în laptele de capră - la nivel de 10^{10} UFC·mL⁻¹ - de tulpinile L14, L42, L46 și 10^9 UFC·mL⁻¹ în cazul tulpinilor L56 și L61, ceea ce reprezintă valori înalte comparativ cu laptele de vacă. Titrul de microorganisme viabile al tulpinii L77 și L27 nu indică diferențe semnificative în laptele de capră și cel de vacă și a fost de 10^8 UFC·mL⁻¹ pentru L77 și 10^7 UFC·mL⁻¹ pentru tulpina L27, ceea ce este suficient pentru utilizarea tulpinilor în calitate de culturi starter pentru obținerea produselor lactate [18]. Rezultatele obținute confirmă un efect stimulator mai sporit al laptelui de capră asupra culturilor probiotice, descris și de alți autori, de ex. numărul de celule vii a culturii starter ABT-5 peste 8 ore de fermentare a constituit 8,63 log UFC ·mL⁻¹ în laptele de capră și 8,37 log UFC ·mL⁻¹ în laptele de vacă [71].

Abilitatea de a inhiba creșterea microorganismelor patogene și condiționat patogene reprezintă o proprietate tehnologică prețioasă a bacteriilor lactice pentru asigurarea calității și siguranței produsului [100]. Activitatea antimicrobiană a bacteriilor lactice este determinată în special de producerea de acizi organici [102, 116].

Este cunoscut faptul că multe tulpini de bifidobacterii și bacterii lactice sunt antagoniști ai genului *Salmonella*, și inhibă creșterea bacteriilor genurilor *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Yersinia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Klebsiella*, *Gardnerella* ș.a. [106]. Relații antagoniste dintre lactobacili, bifidobacterii și microorganismele patogene apar în competiția pentru nutrienți.

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, ceea ce determină contaminarea produsului și încălcarea normativelor sanitar-igienice [68].

Prin urmare, 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 bacterii lactice, în calitate de culturi de referință au fost utilizate tulpinile de *S. aureus* ATCC® 25923™ și *E. coli* ATCC® 25922™.

Activitatea antagonistă a bacteriilor selectate a fost studiată prin metoda de difuzie în agar, determinând gradul de sensibilitate a culturii conform gradației lui Birgher, M. (1982) [124]. Rezultatele cercetărilor privind activitatea antagonista a culturilor de bacterii lactice sunt prezentate în Tabelul 3.6.

Tabelul 3.6. 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	
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

Analizând datele din tabelul 3.6, putem concluziona că tulpinile de bacterii lactice selectate inhibă dezvoltarea microorganismelor patogene [53]. Diametrul zonelor de inhibiție variază între 10-21 mm față de *E. coli* și 9,5-19,5 mm față de *S. aureus*, ce permite inhibarea dezvoltării infecțiilor intestinale. Aceste rezultate confirmă valoarea tulpinilor autohtone, care s-au dovedit a fi mai active față de tulpinile descrise de alți autori. De ex. tulpina *L. diacetylactis* 035ch și *S. thermophilus* 042k-2 selectate din lapte crud au prezentat zone de inhibiție de 14 mm față de microflora patogenă și condiționat patogenă, ceea ce reprezintă o activitate antagonistă mai scăzută comparativ cu tulpinile selectate în cadrul studiului nostru [112]. De asemenea, tulpina *S. thermophilus* T2 selectată din lapte crud și studiată de alți autori, nu a prezentat nici o activitate inhibitoare față de *E. coli* și *S. aureus* [83].

Cercetările efectuate demonstrează posibilitatea de selectare din surse autohtone a tulpinilor de bacterii lactice valoroase cu potențial tehnologic natural (nemodificate genetic) și de utilizare a lor la fabricarea produselor lactate de calitate sigură [50]. Procesul verbal de producere a concentratelor bacteriene de bacterii lactice este prezentat în Anexa 2. Pentru valorificarea proprietăților tehnologice valoroase culturile de bacterii lactice autohtone au fost

testate pe scară industrială. Certificatul de testare industrială a tulpinilor este prezentat în Anexa 3.

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 Nepatogene cu atribuirea numerelor de colecție, după cum urmează:

- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* L 61 depozitat cu numărul CNMN-LB – 73;
- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* L 42 depozitat cu numărul CNMN-LB – 74;
- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* L 14 depozitat cu numărul CNMN-LB – 75;
- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* L 77 depozitat cu numărul CNMN-LB – 76;
- *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* L 27 depozitat cu numărul CNMN-LB – 77;
- *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* L 46 depozitat cu numărul CNMN-LB – 78;
- *Streptococcus thermophilus* L 56 depozitat cu numărul CNMN-LB – 79.

Adeverințele de depozitare a tulpinilor în CNMN sunt prezentate în Anexa 4.

Tulpinile selectate au constituit obiectul cercetărilor ulterioare, orientate spre determinarea potențialului lor biotehnologic.

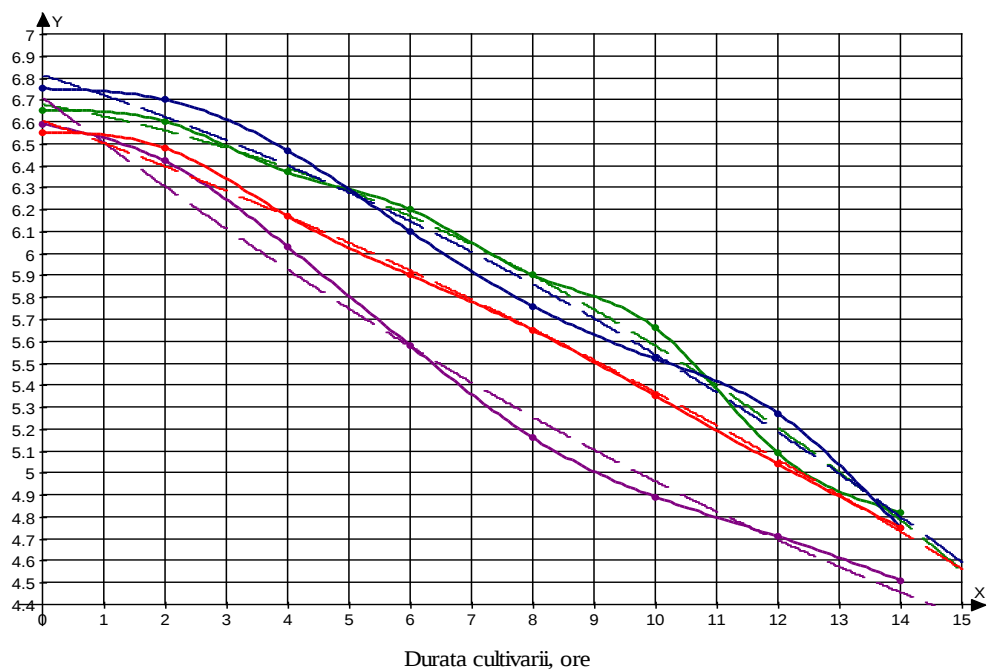
3.4 Determinarea parametrilor biotehnologici optimi pentru culturile de bacterii lactice

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, este important de a stabili condițiile optime de cultivare pentru asigurarea dezvoltării eficiente a bacteriilor lactice și activității lor acidifiante [136].

Sursele bibliografice cu referință la bacteriile lactice relatează că temperatura de cultivare și conținutul mediului nutritiv au o semnificație primordială. De aceea fiecare tulpină reacționează individual la condițiile de cultivare.

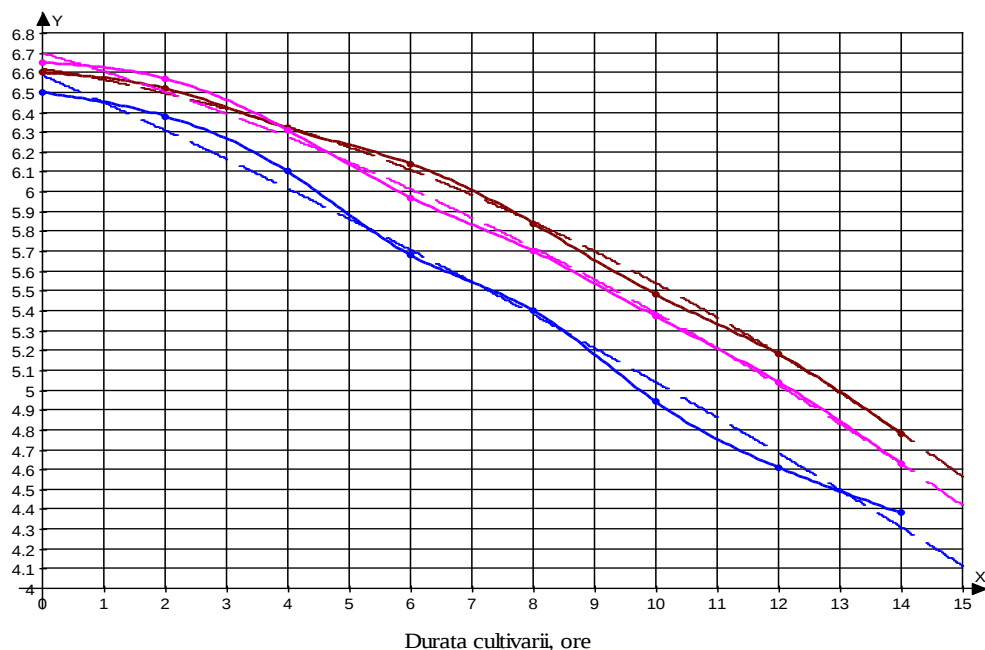
În continuarea cercetărilor realizate la acest capitol, a fost studiată dinamica multiplicării tulpinilor de bacterii lactice selectate și evoluția acidității active în condiții de cultivare periodică în lapte degresat de capră la temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Cercetările au fost efectuate în bioreactorul Sartorius Biostat® A plus, (Germania).

Rezultatele evoluției acidității active a laptelui fermentat în funcție de timpul de cultivare sunt reprezentate în Figura 3.4.



a)

- *L. lactis* biovar *diacetylactis* CNMN-LB-73
 $Y(x) = -0,0063x^2 - 0,0474x + 6,68$
- *L. lactis* CNMN-LB-75
 $Y(x) = -0,0042x^2 - 0,0865x + 6,8125$
- *S. thermophilus* CNMN-LB-79
 $Y(x) = 0,0035x^2 - 0,2098x + 6,7079$
- *L. cremoris* CNMN-LB-78
 $Y(x) = -0,0025x^2 - 0,0987x + 6,6037$



b)

- *L. lactis* CNMN-LB-74
 $Y(x) = -0,0058x^2 - 0,0504x + 6,6208$
- *L. lactis* CNMN-LB-76
 $Y(x) = -0,0020x^2 - 0,1348x + 6,5854$
- *L. cremoris* CNMN-LB-77
 $Y(x) = -0,0042x^2 - 0,0893x + 6,6991$

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

Cu scopul determinării relației dintre schimbarea acidității active și numărul de bacterii lactice viabile, în dependență de durata de cultivare a tulpinilor, a fost realizată analiza de regresie și adoptat modelul polinom ce descrie exact rezultatele experimentelor. Etapele analizei de regresie și construirea intervalului de încredere sunt descrise în compartimentul II al tezei (p. 2.3.37).

Prelucrarea matematică a datelor și ecuațiile de regresie de ordinul doi (x^2) obținute, descriu dependența acidității active de durata cultivării și permit de a prognoza procesul de acidogeneză. Etapele analizei de regresie sunt prezentate în Figurile 3.4 și 3.5.

În rezultatul multiplicării tulpinilor aciditatea activă a atins valoarea $\mu = \text{pH } 4,6$ la 14,0 ore de cultivare.

Datele obținute arată că pe parcursul cultivării se observă scăderea lentă a pH-ului. Astfel, după 14 ore ΔpH al tulpinilor a fost 2,37 unitați, ceea ce indică acumularea acidului lactic prin dezvoltarea intensă și proporțională a bacteriilor lactice.

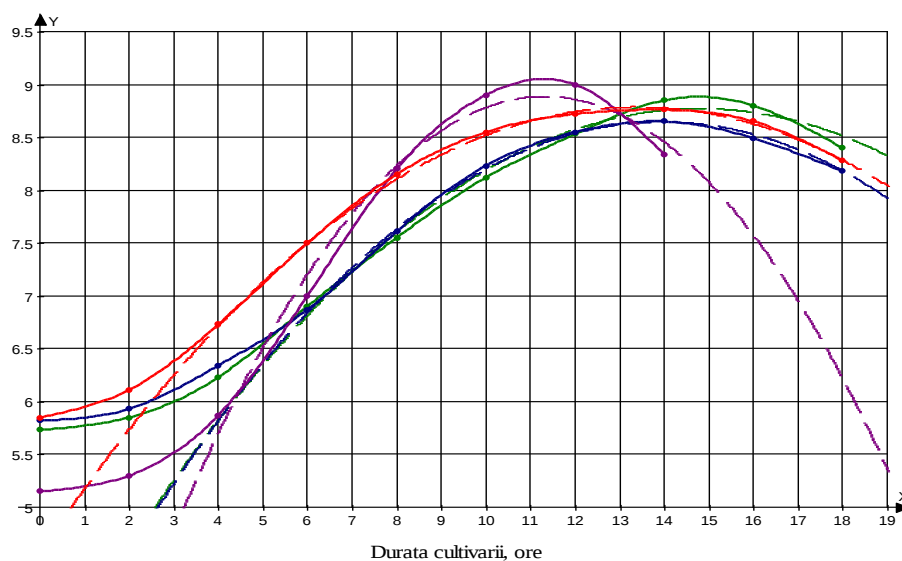
Aciditatea a fost monitorizată paralel cu titrul bacteriilor lactice în decursul procesului de fermentare. S-a constatat că tulpinile *L. lactis biovar diacetylactis* CNMN-LB – 73, *L. lactis* ssp. *lactis* CNMN-LB – 74, *L. lactis* ssp. *lactis* CNMN-LB – 75, *L. lactis* ssp. *cremoris* CNMN-LB – 78 ating sfârșitul fazei de creștere logaritmică și intră în faza staționară după $12 \pm 0,5$ ore de dezvoltare, iar tulpinile *L. lactis* ssp. *lactis* CNMN-LB – 76, *L. lactis* ssp. *cremoris* CNMN-LB – 77 și *S. thermophilus* CNMN-LB-79 după $10 \pm 0,5$ ore. La $12 \pm 0,5$ ore de cultivare în lapte degresat de capră toate tulpinile ating concentrația min de $10^8 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, ceea ce denotă că tulpinile în acest mediu ating rapid valori foarte înalte ale numărului de bacterii viabile.

Figura 3.5 prezintă datele dinamicii dezvoltării tulpinilor și acumulării biomasei în mediul lapte degresat la temperatura $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

Conform modelelor matematice au fost obținute extremele, care pot determina maximumul absolut al funcției - numărul de celule în timpul cultivării, în zonă cercetată la moment. Punctele coincid cu extremele obținute în cadrul experimentului, ceea ce confirmă exactitatea experimentului efectuat (capitolul 2, tabelul 2.3). Totodată, prelucrarea matematică efectuată a evidențiat că ecuațiile de regresie pentru culturile CNMN-LB-73, CNMN-LB-75, CNMN-LB-74, CNMN-LB-76 și CNMN-LB-78 coincid exact cu dinamica procesului de fermentare.

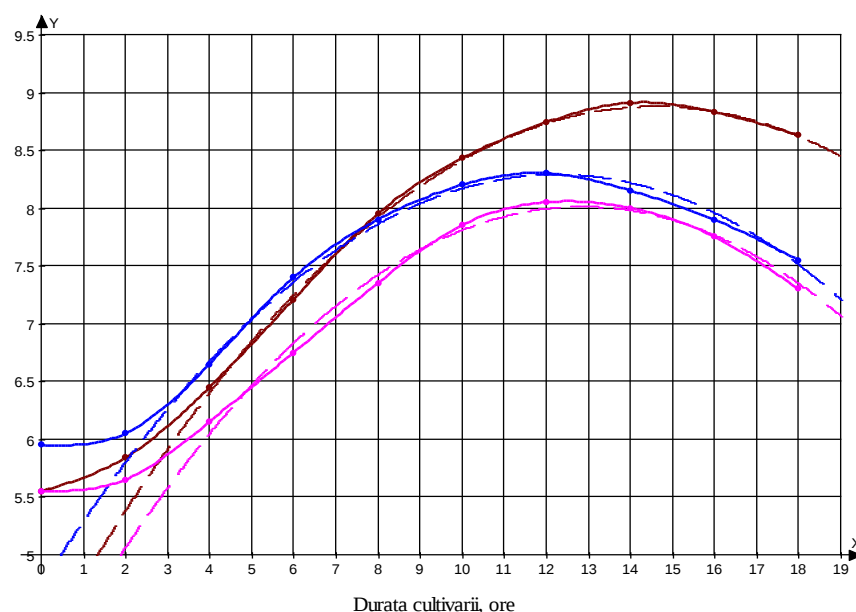
Unii cercetători au raportat despre o capacitate înaltă a bacteriilor lactice de a supraviețui la valori scăzute de pH, și au demonstrat rezistența bacteriilor lactice în mediul cu valori nu mai mici de pH- 4,8 [91, 132].

Din rezultatele respective se observă, că faza de declin la cultivarea tulpinilor s-a început după $12 \pm 0,5$ ore și $10 \pm 0,5$ ore respectiv, indicând faptul că tulpinile selectate sunt mai rezistente la condițiile acide și multiplicarea celulelor se observă până la atingerea valorii pH-ului- 4,7.



a)

$L. lactis$ biovar <i>diacetylactis</i> CNMN-LB-73	$S. thermophilus$ CNMN-LB-79
$Y(x) = -0,0253x^2 + 0,7473x + 3,2583$	$Y(x) = -0,0596x^2 + 1,3449x + 1,3035$
$L. lactis$ CNMN-LB-75	$L. cremoris$ CNMN-LB-78
$Y(x) = -0,0285x^2 + 0,7941x + 3,1202$	$Y(x) = -0,0236x^2 + 0,6299x + 4,5895$



b)

$L. lactis$ CNMN-LB-74	$L. lactis$ CNMN-LB-76
$Y(x) = -0,0221x^2 + 0,6435x + 4,1985$	$Y(x) = -0,0237x^2 + 0,5796x + 4,7508$
$L. cremoris$ CNMN-LB-77	
$Y(x) = -0,0251x^2 + 0,6437x + 3,8896$	

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

În general, tulpinile selectate nu sunt pretențioase față de mediile nutritive și au capacitatea de a fermenta un număr mare de zaharuri, de aceea laptele fermentat se caracterizează prin aciditate moderată, indicând o activitate biochimică suficientă a acestor tulpini anume în laptele de capră.

În publicațiile de specialitate sunt prezentate rezultatele privind variabilitatea activității biochimice a bacteriilor lactice izolate din microflora spontană naturală pe parcursul proceselor de cultivare și păstrare, fapt ce explică necesitatea de a determina stabilitatea și viabilitatea tulpinilor în timpul depozitării produsului la temperatura de refrigerare [119]. Studiile arată că o parte semnificativă a celulelor probiotice își pierde activitatea datorită morții microorganismelor în timpul depozitării produsului [107].

În prezent, colecțiile de microorganisme utilizează metode avansate de păstrare a culturilor pure, precum sunt liofilizarea și depozitarea la temperaturi scăzute [138, 153].

Refrigerarea se utilizează și în scopul asigurării condițiilor optime de desfășurare a unor procese biochimice necesare fabricării produselor lactate sau a unor procese fizico-chimice necesare la anumite etape tehnologice.

Viabilitatea culturilor pure de bacterii lactice la temperatura de refrigerare a fost evaluată periodic pentru fiecare tulpină, pornind de la premiza că refrigerarea, ca și congelarea și liofilizarea, este un factor de stres pentru microorganisme. A fost monitorizată aciditatea titrabilă a laptelui fermentat și numărul de bacterii lactice viabile, înainte de congelare; la 7 zile după congelare, la 14; la 21 și 28 zile de depozitare la temperatura de refrigerare de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. Rezultatele cercetărilor privind determinarea calității ale laptelui de capră fermentat sunt prezentate în Figurile 3.4 și 3.5.

Rezultatele au demonstrat că aciditatea titrabilă produsă în urma fermentării laptelui de capră de către tulpinile studiate, a scăzut după prima săptămână de depozitare de la 88,9 până la 78,1 °T, păstrându-se aciditatea scăzută a laptelui fermentat. Post-acidularea a avut loc în timpul răcirii și acest lucru poate fi explicat prin activitatea metabolică reziduală a bacteriilor lactice. Activitatea β -galactozidazei eliberată de către bacterii lactice pentru scindarea lactozei este încă activă chiar și la temperatura de refrigerare [76]. Acest lucru contribuie la acumularea de acid lactic, acid acetic, acid citric, acidul butiric, acetaldehida și acidul formic produse de către cultura starter [37, 92, 94].

Viabilitatea bacteriilor lactice a fost afectată de aciditate. În rezultatul cercetărilor s-a constatat, că scăderea numărului de bacterii lactice viabile în prima săptămână de depozitare a laptelui fermentat este legată de creșterea concomitentă a acidității (figura 3.4), dar concentrația

finală de bacterii lactice în laptele fermentat a rămas la nivel de probiotic (min. $7,5 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de către tulpina LB-77), ceea ce constituie o premiză pentru obținerea unui produs cu proprietăți probiotice și cu o durată de păstrare îndelungată [70].

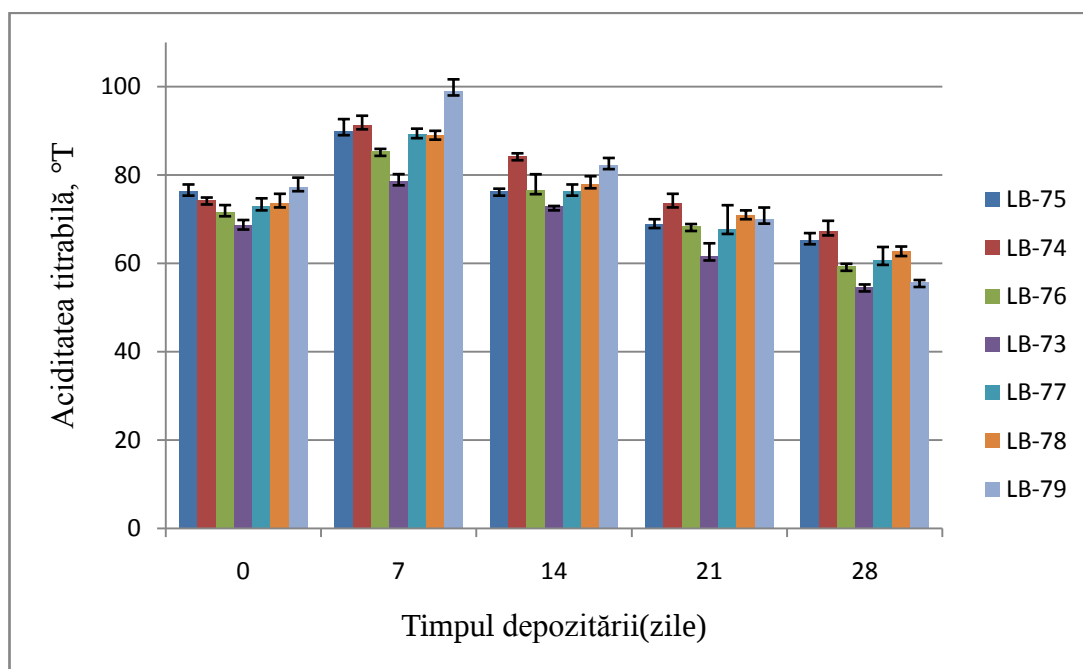


Fig. 3.6. Aciditatea titrabilă a laptelui fermentat în timpul depozitării

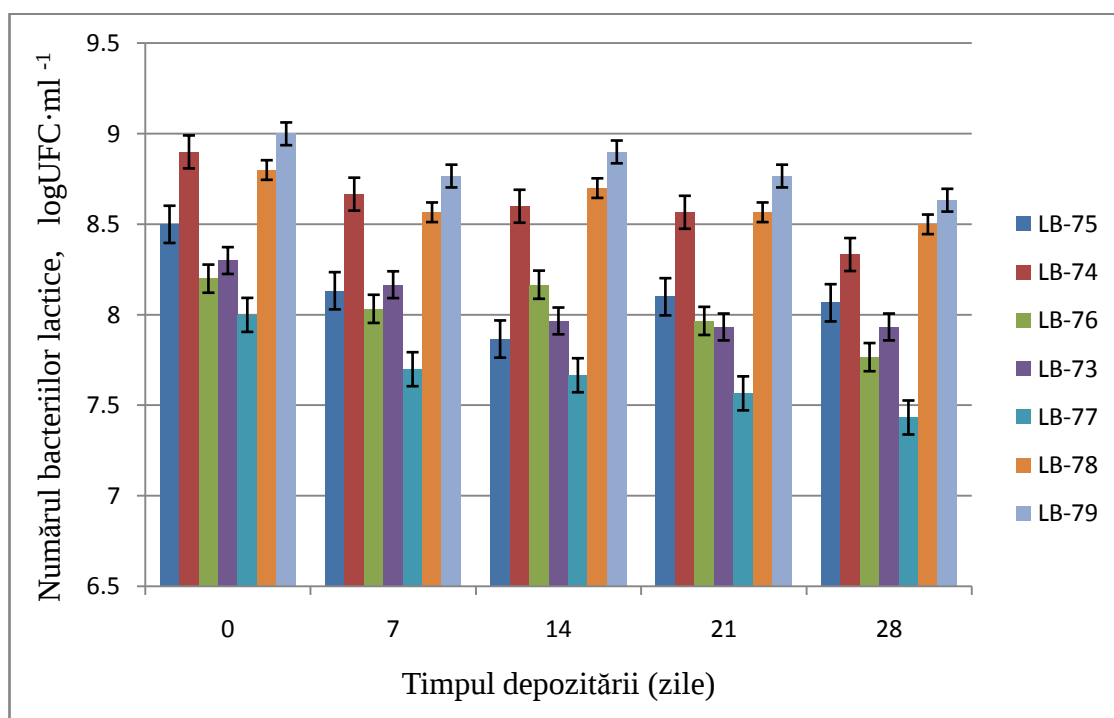


Fig. 3.7. Numărul de bacterii lactice viabile în timpul depozitării

Rezultate obținute confirmă păstrarea proprietăților biotehnologice și capacitatea sporită de regenerare a tulpinilor în mediul din lapte de capră, descrise și de alți autori [113]. Conform

studiului bibliografic, laptele fermentat se caracterizează prin proprietăți probiotice atunci când bacteriile viabile din produs la momentul consumului sunt în concentrații nu mai mici decât 10^6 UFC/ml [80, 104]. Astfel, este necesar ca majoritatea acestor culturi vii să supraviețuiască pe durata perioadei de valabilitate a produsului, înainte de a fi consumate.

3.5 Mediul nutritiv pentru cultivarea bacteriilor lactice izolate din laptele de capră

Este cunoscut faptul că mediile pentru cultivarea microorganismelor lactice trebuie să corespundă următoarelor cerințe: să fie ușor asimilabile, cu un conținut necesar de substanțe nutritive (compuși azotați, carbohidrați, vitamine, săruri minerale), un anumit indice hidrogenic (pH), să posede un potențial optimal de oxido-reducere. Mediul nutritiv trebuie să conțină o cantitate necesară de apă și trebuie să fie neapărat steril. Pentru prepararea mediilor nutritive se utilizează diferite produse naturale, pentru cultivarea bacteriilor lactice fiind selectate medii speciale pe bază de lapte [172].

În scopul utilizării industriale a microorganismelor, este necesară ameliorarea constantă a activității lor vitale, intensificarea proceselor de creștere și reproducere. Mediile din lapte degresat hidrolizat se utilizează pe scară largă pentru sporirea biomasei bacteriilor lactice și menținerea concentrației maxime a celulelor. În laptele hidrolizat se păstrează toate elementele nutritive necesare pentru dezvoltarea și creșterea bacteriilor lactice, în special proteinele care sunt descompuse până la aminoacizi, mult mai ușor asimilați de către bacterii [119].

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, deoarece prin raportul componenților (grăsimi, proteine, lactoză, vitamine, aminoacizi și a.) laptele de capră este mai bogat în substanțe nutritive și își manifestă proprietățile biochimice specifice mai pronunțat decât laptele de vacă.

De aceea în continuare au fost efectuate experiențe de determinare comparativă a parametrilor de creștere și dezvoltare a tulpinilor izolate: au fost studiate dinamica creșterii, aciditatea activă și numărul de microorganisme viabile pe mediul din lapte de vacă și mediul din lapte de capră.

Studierea procesului de acumulare a biomasei, acidității și parametrii cinetici ai creșterii culturii s-a efectuat la fiecare 2 ore, a numărului de celule viabile - fiecare 6 ore, pornind de la valoarea inițială a pH -7,0 a mediilor și un inocul inițial de 3%.

Tabelul 3.7 prezintă datele dezvoltării tulpinilor de bacterii lactice selectate și acumulării biomasei în mediul din lapte de vacă degresat și în mediul din lapte de capră degresat după 24

ore de cultivare la temperatura $30\pm 2^{\circ}\text{C}$. Trebuie notat faptul că toate tulpinile studiate au demonstrat diferențe semnificative a parametrilor în procesul de cultivare pe ambele tipuri de medii.

Tabelul 3.7. Indicatori ai creșterii, formării de acid și a creșterii biomasei în medii nutritive

Tulpina	pH		Biomasa, mg/ml		Numărul bacteriilor lactice, UFC/ml	
	Mediul					
	din lapte de vacă	din lapte de capră	din lapte de vacă	din lapte de capră	din lapte de vacă	din 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 din lapte de capră are o influență semnificativă asupra viabilității tulpinilor selectate, ceea ce contribuie la sporirea proprietăților lor biotehnologice importante.

Rezultatele studiului comparativ al dinamicii creșterii culturilor în mediul de lapte de capră și cel de lapte de vacă sunt prezentate în figura 3.8.

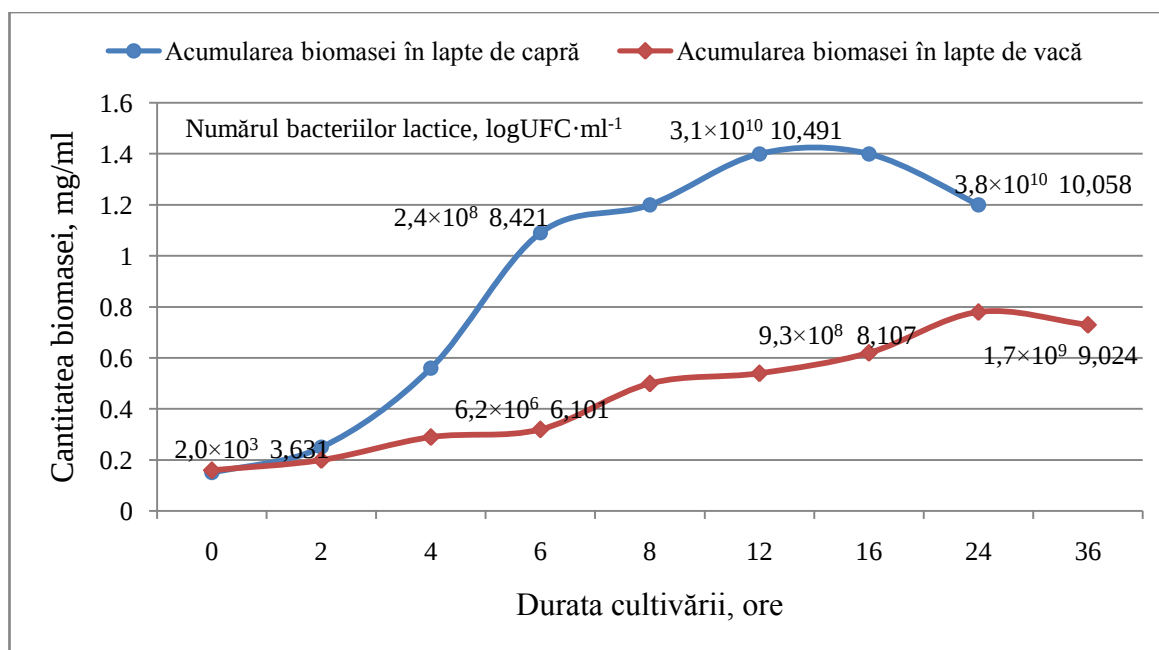


Fig. 3.8. Dinamica dezvoltării tulpinii CNMN-LB-75 și acumulării biomasei în medii nutritive la temperatura $30\pm 2^{\circ}\text{C}$

Conform rezultatelor obținute, se observă o diferență semnificativă în ceea ce privește cantitatea și viteza de acumulare a biomasei la tulpina *L. lactis* CNMN-LB-75 pe aceste 2 medii.

Indicii obținuți la cultivarea acestei tulpini pe mediu din lapte de capră sunt net superiori: acumularea biomasei în primele 12 ore de cultivare atinge 1,4 mg/ml cu valoarea acidității active moderate pH=4,5 și numărul maxim al bacteriilor lactice de $3,8 \times 10^{10}$ UFC/ml în faza staționară, durata de creștere exponențială constituind 6 ore. Din rezultatele respective se observă, că tulpina selectată, în mediu nutritiv din lapte de capră, atinge rapid valori mai înalte ale numărului de bacterii viabile.

Pentru o descriere mai detaliată a dezvoltării tulpinii CNMN-LB-75 pe mediile studiate, a fost important să se determine parametrii de creștere (Tabelul 3.8). Datele obținute arată că tulpina CNMN-LB-75 în lapte de capră se caracterizează prin rata specifică de creștere $\mu = 0,186$ oră⁻¹ cu cel mai mic timp de generație $g = 3,725$ ore. Mai lent, tulpina s-a dezvoltat în mediul de control, în care a înregistrat o rată specifică de creștere $\mu = 0,101$ oră⁻¹ cu timpul de generație $g = 6,861$ ore.

Tabelul 3.8. Parametrii cinetici ai creșterii exponențiale a tulpinii CNMN-LB-75

Parametrii	Tulpina CNMN-LB-75	
	mediul de lapte de vacă	mediul de lapte de capră
g, oră	6,861	3,725
μ , oră ⁻¹	0,101	0,186

Studiul efectuat indică asupra faptului, că componența mediului din lapte de capră influențează pozitiv procesul de multiplicare și acumulare a biomasei tulpinilor bacteriene. Tulpinile studiate se caracterizează printr-o viteză de dezvoltare rapidă pe parcursul fazei exponențiale și un timp scurt de generare – proprietăți biotehnologice valoroase pentru culturile utilizate în industria alimentară.

3.6 Optimizarea mediului de protecție pentru liofilizarea tulpinilor de bacterii lactice

Utilizarea la scara industrială a microorganismelor în calitate de culturi starter impune o strategie de conservare efectivă a tulpinilor, care va asigura menținerea viabilității, stabilității, purității și capacității lor bioproductive. Optimizarea mediului duce la activizarea sistemelor metabolice responsabile de productivitatea celulelor bacteriene. În pofida numărului mare de publicații dedicate mediilor de cultivare a bacteriilor lactice, cercetarea, modificarea sau optimizarea unor medii cunoscute, este relevantă până în prezent.

Liofilizarea culturilor de bacterii lactice selectate s-a efectuat la stația pilot a Laboratorului de Biotehnologii alimentare al IȘPHTA formată din: bioreactorul Biostat Sartorius Aplus, centrifuga cu răcire Rotina 38R și sistema de liofilizare LABCONCO.

Înainte de liofilizare culturile bacteriene au fost cultivate în mediul din lapte hidrolizat la temperatura 30 °C până la atingerea valorii pH =4,6 a mediului. 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), citrat de sodiu (5%), zaharoză (10%), gelatină (5%), glutamat de sodiu (2,5%). [119]. Suspensia obținută a fost repartizată a câte 2 ml în flacoane și liofilizată la regimul elaborat de Laboratorul de Biotehnologii Alimentare.

După procesul de liofilizare a culturilor în mediu de protecție din lapte de vacă s-a constatat că viabilitatea culturilor scade cu titrul bacteriilor înainte de liofilizare de la $10^9 \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ până la $10^7 \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$.

În acest context, direcția de cercetare privind sporirea viabilității culturilor izolate din lapte de capră după liofilizare presupune efectuarea investigațiilor de optimizare a mediului protector.

La înlocuirea laptelui de vacă cu laptele de capră în componența mediului de protecție s-a ținut cont de rezultatele obținute anterior, care au arătat efectul pozitiv asupra sporirii viabilității și dinamicii dezvoltării culturilor selectate în mediul din lapte de capră.

Prin urmare, acumularea biomasei culturilor bacteriene înainte de liofilizare s-a efectuat în mediul pe bază de lapte hidrolizat de capră. Ulterior biomasa a fost separată și suspendată în mediul de protecție. Suspensia obținută a fost repartizată în flacoane și liofilizată.

Raportul optim al componentelor primordiale ale mediului protector (lapte degresat de capră și citrat de sodiu) a fost determinat cu aplicarea metodei de planificare matematică a experiențelor. În condiții de laborator (Direcția „Tehnologii Alimentare”, IP IȘPHTA) au fost fabricate 9 mostre experimentale de tulpini liofilizate în corespundere cu matricea de planificare a experimentului factorial cu 2 factori (Tabelul 2.4, capitolul 2).

După evaluarea numărului de celule viabile în fiecare din variantele experimentale, a fost întocmită ecuația de regresie pentru varianta cu mediul pe bază de lapte de capră (3.1) și cea cu mediu pe bază de lapte de vacă (3.2) care descrie veridic ($p < 0,05$) în valori reale modificarea viabilității bacteriilor lactice în funcție de medii de protecție.

Astfel, ecuația de regresie obținută este următoarea:

$$\text{Pentru lapte de capră } Y = 44,612 + 0,378L_c - 0,375C_s + 0,027L_c \times C_s \quad (3.1)$$

$$\text{Pentru lapte de vacă } Y = 49,15 + 0,20L_v - 8,77C_s + 0,13L_v \times C_s \quad (3.2)$$

unde:

Y – viabilitatea bacteriilor, %;

L – conținutul de lapte de capră în mediul de protecție, %

C – conținutul de citrat de sodiu, %

Vizualizarea grafică a ecuației de regresie polinomice 3.1 este prezentată în Figură 3.9.

Analiza detaliată a ecuației 3.1 ne permite să afirmăm, că laptele de capră în mediul protector are o influență semnificativă asupra productivității și viabilității culturilor de bacterii lactice izolate din laptele de capră, ceea ce contribuie la păstrarea proprietăților lor biotehnologice importante.

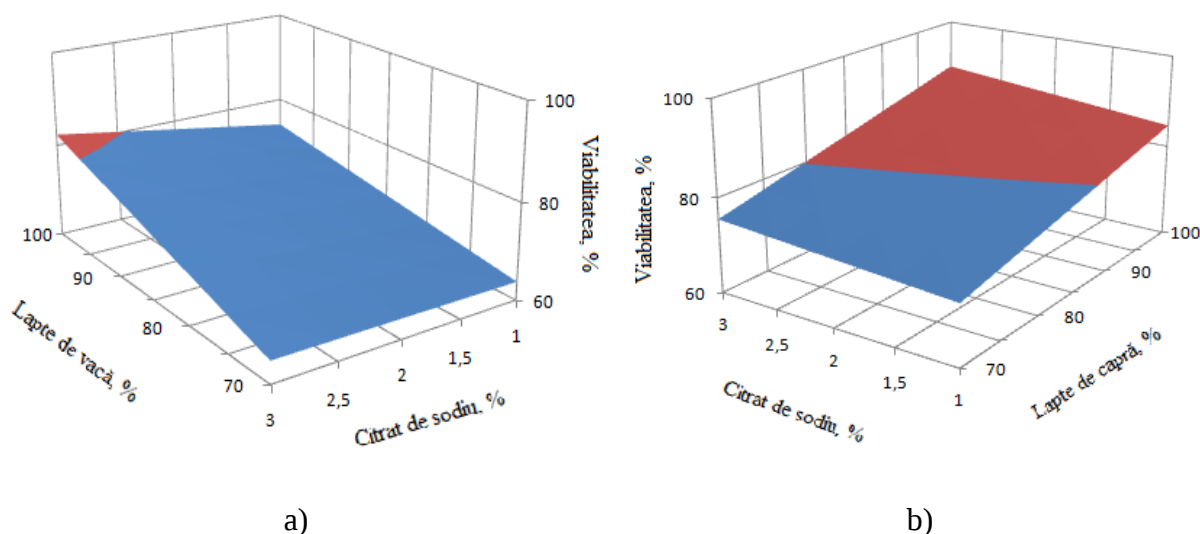


Fig. 3.9. Reprezentarea grafică a modelului matematic de viabilitate a bacteriilor lactice după liofilizare în mediul compus: a) din laptele de vacă degresat; b) din laptele de capră degresat

În urma cercetărilor efectuate s-a stabilit componența optimă a mediului protector necesară pentru păstrarea tulpinilor și fabricarea concentratelor bacteriene prin metoda de uscare prin liofilizare: lapte degresat de capră cu 16% substanțe uscate – 80%, citrat de sodiu – 2,5%, zaharoză -10%, gelatină -5%, glutamat de sodiu -2,5% [49].

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

Proprietățile biotehnologice ale tulpinilor autohtone de bacterii lactice după păstrarea în stare liofilizată

Păstrarea de lungă durată a proprietăților biotehnologice ale tulpinilor de bacterii lactice destinate fabricării brânzei sărate este un parametru important în elaborarea culturilor starter.

Una din aceste proprietăți biotehnologice este activitatea de post-acidulare scăzută manifestată la păstrare (refrigerare) timp de 28 zile [170].

Astfel, în vederea aprecierii eficienței mediului optimizat de liofilizare, au fost monitorizate proprietățile biotehnologice principale: activitatea antimicrobiană, activitatea fermentativă și activitatea de acidulare a tulpinilor selectate CNMN-LB-73, CNMN-LB-74, CNMN-LB-75, CNMN-LB-76, CNMN-LB-77, CNMN-LB-78, CNMN-LB-79 după păstrare în stare liofilizată timp de 6 luni.

Dinamica acidității active a tulpinilor autohtone de bacterii lactice după păstrare timp de 6 luni a fost monitorizată în bioreactorul Sartorius Biostat® A plus. Culturile au fost restabilite din stare liofilizată și inoculate în lapte de capră steril degresat, termostătate la temperatura 30°C timp de 24 ore. Analiza rezultatelor a relevat cea mai sporită activitate de acidulare la tulpinile LB-76 și LB-77 cu valori pH=4,4 și pH=4,5 respectiv. Rezultatele sunt reprezentate în Figura 3.10.

Scăderea valorii pH-ului (creșterea acidității) determină gradul de dizolvare a fosfatului de calciu coloidal, care afectează sensibilitatea cazeinei la proteoliză în timpul fabricării brânzeturilor, ceea ce determină textura brânzei (densitatea, prezența sau absența ochilor), maleabilitatea și capacitatea de topire a acesteia.

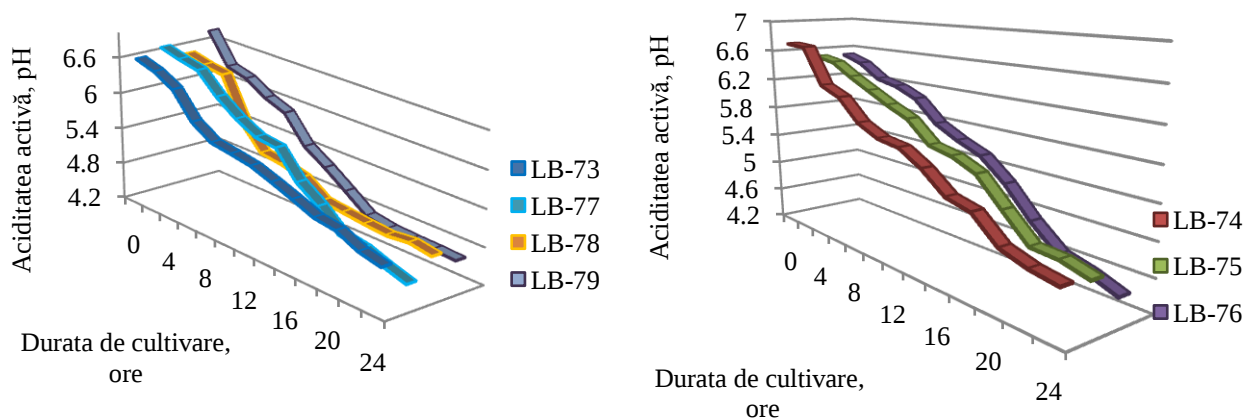


Fig. 3.10. Modificarea acidității active a laptelui de capră fermentat cu tulpini de bacterii lactice cultivate timp de 24 ore

Rezultatele asupra activității de acidulare și activității fermentative a tulpinilor au permis de a selecta tulpinile LB-73, LB-74, LB-75, LB-78, LB-79 cu valori optime de aciditate activă care se încadrează în normele stabilite în SM 308:2012 ”Concentrate bacteriene liofilizate destinate fabricării produselor lactate fermentate” și sunt de perspectivă pentru utilizarea în compoziția culturii starter destinată obținerii brânzei.

Pentru determinarea acțiunii procesului de liofilizare asupra activității antimicrobiene a culturilor de bacterii lactice, au fost utilizate tulpinile de referință *S. aureus* ATCC® 25923™ și *E. coli* ATCC® 25922™. Rezultatele cercetărilor privind activitatea antagonistă a culturilor de bacterii lactice înainte de liofilizare și după reactivare din stare liofilizată sunt prezentate în Tabelul 3.9.

Tabelul 3.9. Proprietățile antimicrobiene ale tulpinilor de bacterii lactice reactivate

Codul tulpinii	Cultura de referință			
	<i>E. coli</i> ATCC® 25922™		<i>S. aureus</i> ATCC® 25923™	
	Diametrul zonei de inhibiție, mm			
	inainte de liofilizare	restabilite	inainte de liofilizare	restabilite
CNMN-LB-73	13,2±0,4	13,1±0,1	12,1±0,3	12,0 ±0,2
CNMN-LB-74	14,0±0,0	13,5±0,3	12,5±0,2	12,2±0,1
CNMN-LB-75	15,4±0,4	15,0±0,1	14,1±0,2	13,8±0,1
CNMN-LB-76	10,0±0,3	9,6±0,1	10,6±0,2	9,1±0,1
CNMN-LB-77	11,1±0,2	8,2±0,2	9,5±0,3	8,0±0,1
CNMN-LB-78	14,5±0,2	13,8±0,1	14,1±0,2	12,2±0,2
CNMN-LB-79	20,9±0,5	18,7±0,2	19,5±0,2	18,1±0,3

Analizând datele din tabelul 3.9, putem concluziona că după 6 luni de depozitare în stare liofilizată tulpinile LB-76 și LB-77 au demonstrat o scădere a activității antagoniste față de culturile de referință în comparație cu indicii inițiali până la liofilizare. Rezultatele privind proprietățile antimicrobiene ale tulpinilor LB-73, LB-74, LB-75, LB-78, LB-79 au demonstrat că, deși în timpul depozitării activitatea antagonistă a culturilor date a avut tendința de scădere, totuși aceste schimbări nu au fost semnificative față de indicii inițiali și s-au încadrat în limitele corespunzătoare de sensibilitate moderată.

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

3.7 Concluzii la capitolul 3

1. În rezultatul efectuării cercetărilor expuse în capitolul 3, din microflora laptelui crud de capră au fost izolate, identificate, descrise și propuse pentru includerea în culturi starter pentru fabricarea brânzei a tulpinilor autohtone de bacterii lactice cu proprietăți biotehnologice valoroase [8, 42, 44, 46, 47, 48, 52, 125].
2. Tulpinile selectate se caracterizează printr-o activitate mai intensă de acidulare a laptelui de capră în comparație cu laptele de vacă, asigurând o aciditate a laptelui de 68-93°C în

timp de 5-7 ore. Tulpina *L. lactis biovar diacetylactis* CNMN-LB – 73 produce cantități suficiente de substanțe aromatice, ceea ce permite ameliorarea calității organoleptice a produselor lactate fabricate din lapte de capră [45, 47, 51, 101, 125].

3. A fost determinată activitatea antagonistă a tulpinilor autohtone împotriva microorganismelor patogene. Zona de inhibare variază între 10-21 mm față de *Escherichia coli* și 9,5-19,5 mm față de *Staphylococcus aureus*, ceea ce indică asupra eficacității tulpinilor propuse în prevenirea infecțiilor intestinale și inhibarea dezvoltării patogenilor în probele de lapte fermentat [7, 50].
4. Utilizarea mediului de cultură din lapte de capră mai bogat în substanțe nutritive, asigură un randament înalt de acumulare a biomasei și păstrare a proprietăților biotehnologice valoroase ale tulpinilor de bacterii lactice. Rata specifică de creștere înregistrată de tulpinile studiate pe mediul cu lapte de capră constiuie $\mu = 0,186 \text{ oră}^{-1}$, iar timpul de generație $g = 3,725$. [6, 43, 49].
5. Aplicarea metodei matematice de planificare a experiențelor a permis stabilirea compoziției optime a mediului de protecție pentru conservarea, păstrarea viabilității și proprietăților biotehnologice ale tulpinilor autohtone de bacterii lactice mezofile și termofile, care conține laptele degresat de capră (80%), citrat de sodiu (2,5%), zaharoză (10%), gelatină (5%), glutamat de sodiu (2,5%), și care asigură un nivel de 90% al viabilității bacteriilor lactice după liofilizare [49].
6. Indicii biotehnologici ai culturilor liofilizate în mediul protector optimizat se păstrează după 6 luni de depozitare și revin la indicii productivi inițiali după reactivarea prin 3 pasaje succesive pe mediul cu lapte de capră degresat.

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

În ultimul timp, piața produselor lactate fermentate s-a extins în mod semnificativ, grație utilizării bacteriilor lactice, ce îndeplinesc funcții fundamentale importante, determinând caracteristicile și calitatea produsului finit. În industria alimentară, aplicarea culturilor starter stabile cu proprietăți selecționate asigură un proces controlat de prelucrare a materiei prime complexe și fabricare a produselor fermentate [2, 164, 171, 177].

Prin selectarea microorganismelor pot fi obținute culturile starter de tulpini de bacterii lactice cu proprietăți biotehnologice speciale, în scopul fabricării unor produse noi de calitate sigură. Păstrarea de lungă durată a activității biochimice și viabilității tulpinilor valoroase (raportul dintre celulele active și inactive în populațiile microbiene) depinde de factorii externi (compoziția mediului nutritiv, temperatura, etc.) și proprietățile tehnologice ale tulpinilor. Ținând cont de toate acestea, proprietățile funcționale ale produselor alimentare fermentate de lactobacterii depind în mare măsură de proprietățile tulpinilor selecționate și de cantitățile lor în produsul finit [4, 5, 54, 158].

La selectarea tulpinilor funcțional active de microorganisme lactice sunt apreciați astfel de parametri, cum ar fi acidogeneza, activitatea antagonistă împotriva microflorei patogene și condiționat patogene, rezistența la bilă, concentrații mari de săruri și valori înalte ale pH-ului.

Mulți specialiști din industria laptelui confirmă necesitatea și importanța utilizării în procesul de obținere industrială de alimente funcționale a tulpinilor autohtone de bacterii lactice. De aceea în ultimul timp a crescut interesul pentru izolarea și valorificarea tulpinilor autohtone de bacterii lactice competitive, relevante pentru industria alimentară și cu proprietăți probiotice [69].

Pentru asigurarea proprietăților funcționale, nivelul minim al celulelor viabile de bacterii lactice dintr-un produs lactat fermentat trebuie să fie de cel puțin 10^6 UFC/ cm^3 pe întreaga durată de valabilitate a produsului [118, 165, 172]. În prezent, există o tendință de creștere a normei conținutului de celule viabile de culturi probiotice în produs: în unele țări din Europa de Vest nivelul minim al celulelor a crescut la 10^7 UFC/ cm^3 [146].

În anul 2015, la Congresul Federației Europene a Societăților de Microbiologie (FEMS), a fost introdus un concept privind includerea în produsele alimentare a consoțiilor probiotice policomponente de bacterii lactice, pentru prevenirea diferitelor boli [161].

Este cunoscut faptul, că culturile starter multiple, în comparație cu monoculturile, posedă o activitate biochimică mai sporită și o rezistență mai înaltă la diferiți factori negativi, oferind produselor obținute proprietăți probiotice complet noi [145].

De aceea tulpinile autohtone de bacterii lactice mezofile și termofile au fost în continuare incluse în asociații simbiotice, destinate fermentării laptelui de capră, pentru obținerea brânzei.

Rezultatele cercetărilor efectuate și descrise în Capitolul 4 al prezentei lucrării au stat la baza elaborării tehnologiei de fabricare a brânzei din lapte de capră descrisă în documentele tehnico-normative: Standardul de Firmă și Instrucțiunea tehnologică privind fabricarea brânzei din lapte de capră și oaie (Anexa 7), și au fost incluse în brevetul de invenție MD 1299Y „Procedeu de obținere a brânzei din lapte de capră” [7] (Anexa 10).

De asemenea, rezultatele cercetărilor efectuate și descrise în acest capitol au servit drept bază pentru elaborarea Standardului Moldovenesc „Brânză din lapte de capră și de oaie. Specificații”. Documentul tehnico-normativ a fost elaborat conform datelor obținute în investigațiile referitor la laptele de capră și aplicarea culturii starter elaborate, au fost stipulați indicii de calitate a produsului finit, și cerințele de siguranță garantată, cu un termen de valabilitate îndelungat.

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

1. Asocierea tulpinilor de bacterii lactice autohtone în cultura starter pentru fabricarea brânzei;
2. Aprecierea parametrilor laptelui de capră în calitate de materie primă pentru fabricarea brânzeturilor;
3. Includerea culturii starter elaborate în procesul tehnologic de fabricare a brânzei din lapte de capră;
4. Determinarea caracteristicilor de calitate și termenului de valabilitate ale brânzei;
5. Studiul de fezabilitate economică a fabricării brânzei cu utilizarea culturii starter autohtone.

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

Noțiunea de *cultură starter* a fost utilizată la început numai pentru bacteriile lactice. Între timp, utilizarea ei s-a extins pentru toate culturile selecționate care se adaugă exogen la diferite etape ale procesului tehnologic de fabricare a produselor alimentare, fiind denumite culturi starter complementare sau secundare.

Perfecționarea și coordonarea activității microorganismelor selecționate, utilizate sub formă de culturi starter și capabile să coabiteze cu microbiota indigenă din lapte, mult mai bine adaptată la condițiile tehnologice, permite diversificarea continuă a sortimentelor de brânzeturi. Aplicarea bacteriilor lactice selecționate în compoziția culturii starter destinată fermentării laptelui de capră va permite sporirea valorii nutritive și calității produsului finit [113]. Stabilirea compoziției culturii starter este condiționată atât de caracteristicile specifice ale produsului finit, cât și de cerințele consumatorilor.

Calitatea microbiologică a brânzeturilor sărate poate fi influențată de numeroși factori, inclusiv calitatea laptelui - materie primă, utilizarea pasteurizării sau termizării laptelui, diverși parametri tehnologici, nivelul și tipul de contaminare microbiană care apare în timpul fabricării sau depozitării brânzei. Brânza sărată se maturează o perioadă îndelungată, iar microflora dominantă are o contribuție semnificativă la toate etapele tehnologice, pornind de la procesul de maturare până la depozitarea produsului, determinând calitatea și siguranța sa.

Tradițional, brânzeturile sunt fabricate din lapte crud, iar aroma lor este intensă și picantă. Laptele crud este folosit de fabricile mici, în timp ce fabricile mai mari utilizează lapte tratat termic, încălzit la 65°C timp de 15-18 sec. Deși pasteurizarea distruge bacteriile patogene, anumiți agenți patogeni (de ex. *Listeria monocytogenes* și *Escherichia coli*) pot supraviețui și pot contamina produsul final.

Industria laptelui cunoaște mai multe cazuri triste cu privire la prezența bacteriilor patogene în brânză, cu implicarea *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* [95].

Deoarece bacteriile genului *Listeria* și alte bacterii patogene sunt halotolerante, există o preocupare importantă cu privire la supraviețuirea și/sau creșterea acestor contaminanți în soluțiile saline utilizate pentru depozitarea brânzeturilor în saramură. Bacteriile prezente în brânză contaminează rapid soluția, iar agentul patogen este inactivat mai greu în saramură decât în brânză.

Conform normelor legislative, pentru fabricarea brânzeturilor în condiții industriale trebuie să fie utilizate, atât laptele pasteurizat, cât și culturi starter cu activitate antagonistă sporită, ce ar asigura obținerea unui produs de calitate și siguranța înaltă, cu termen de păstrare îndelungat.

Diferite culturi starter constituite din bacteriile lactice mezofile și/sau termofile sunt utilizate în producerea brânzeturilor, cele mai importante fiind lactococii *L. lactis subsp. lactis* și *L. lactis subsp. cremoris*. Dar, ținând cont de caracteristicile specifice ale laptelui de capră (miros și gust specific) care se amplifică în brânzeturi, am decis să asociem tulpinile autohtone de bacterii lactice mezo-termofile cu tulpina *L. lactis biovar diacetylactis*, care permite eliminarea substanțială a acestei caracteristici specifice. În rezultat, au fost propuse pentru includerea în cultura starter simbiotică mixtă, a tulpinilor *L. lactis*, *L. cremoris*, *L. lactis biovar diacetylactis* și a tulpinii de *Streptococcus thermophilus*, ce facilitează separarea zerului [120, 165].

Lactococii sunt 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 de *S. thermophilus*, de rând cu 2-3 tulpini de lactococci mezofili, contribuie la sporirea rezistenței culturii starter la bacteriofagi și la variațiile sezoniere ale calității laptelui [169, 170].

De asemenea, pentru fabricarea brânzei cu o perioadă de păstrare îndelungată este necesară selectarea tulpinilor cu activitate post-acidulantă scăzută pH=4,6-4,65 stabilă după depozitare timp de 28 de zile.

În studiile anterioare au fost luate în considerare toate aspectele specifice sus numite pentru fabricarea brânzei din lapte de capră, de aceea pentru elaborarea culturii starter, din cele 7 tulpini autohtone noi au fost selectate 5 tulpini cu proprietăți biotehnologice valoroase pentru industria laptelui.

În calitate de cultură starter de referință a fost aleasă cultura starter mixtă pentru fabricarea brânzeturilor produsă de compania DANISCO (Danemarca). Compoziția uscată CHOOZIT series MA 4001/4002 LYO, compusă din *L. lactis*, *L. cremoris*, *L. lactis biovar diacetylactis* și *S. thermophilus*, asigură un gust adițional plăcut brânzeturilor [61].

În pofida similarității componenței specie-specifice a culturilor starter, precum și a materiei prime, calitatea produsului fabricat poate fi considerabil diferită. Deși, componența culturilor starter fabricate de diferite companii producătoare este asemănătoare, totuși relațiile dintre genurile, speciile și subspeciile de microorganisme utilizate diferă [105, 131].

În continuare, au fost efectuate cercetări privind asocierea tulpinilor de bacterii lactice autohtone. În scopul valorificării potențialului biotehnologic al tulpinilor selectate, cinci dintre ele au fost incluse în asociații simbiotice pentru utilizarea lor în prepararea culturii starter autohtone și analizată comparativ cu cultura starter de import CHOOZIT series MA 4001/4002 LYO, ținând cont de fezabilitatea economică a utilizării culturii starter de import în procesul tehnologic.

Pentru început, au fost evaluate caracteristicile biotehnologice ale tulpinilor de bacterii lactice reactivate din starea liofilizată. Rezultatele evaluării sunt prezentate în Tabelul 4.1.

Tabelul 4.1. Caracteristicile tehnologice ale culturilor liofilizate de bacterii lactice

Caracteristici	Tulpini de bacterii lactice CNMN-				
	LB-73	LB-74	LB-75	LB-78	LB-79
Durata de restabilire, ore	18,1±0,2	15,8±0,2	14,4±0,5	16,0±0,1	8,0±0,3
Aspectul microscopic	Coci, asociați în diplococi				Coci, asociați în diplococi și în lanțuri de diferite lungimi
Aspectul coagulului și consistența	Omogenă, densă				consistență cremoasa
Eliminarea zerului	cu eliminarea zerului				fără eliminare de zer
Activitatea acidifiantă în lapte integral, inocul 5% cultură					
Durata coagulării, ore	7,5±1,0	4,5±1,0	5,0±1,2	6,0±0,5	5,0±0,1
Aciditatea titrabilă, °T	65±0,2	78±1,6	74±0,5	67±0,1	71±0,3
Sinereza,ml	2,3	2,15	2,0	2,25	0

În corespundere cu proprietățile tehnologice, tulpinile de bacterii lactice au fost unite în asociații simbiotice. Culturile starter pentru fabricarea brânzei trebuie să fie alcătuite din tulpini mezofile și termofile în raport 3:1. De aceea la etapa următoare au fost create și studiate asociații formate din cinci tulpini. Pentru îmbinarea tulpinilor de aceeași specie, tulpinile selectate de *L. lactis*, au fost asociate treptat în raport 1:1, studiindu-se compatibilitatea lor la nivel de acțiune acidifiantă și coagulantă. În baza asociației formate în cadrul speciei *L. lactis* (baza culturii starter), au fost alcătuite 2 asociații de tulpini pentru culturi starter destinate fabricării brânzei.

Tulpinile au fost inoculate în laptele de capră. După incubare, până la obținerea coagulului, asociațiile obținute au fost reînsămânțate de două ori în lapte de capră degresat steril.

Au fost selectate 2 asociații, ce au demonstrat acțiuni de acidogeneză intensă – în maxim 7 ore, cu formarea unui coagul omogen, dens, și pe frotiul microscopic al cărora se observă dezvoltarea bacteriilor lactice mezofile și a tulpinii de *S. thermophilus*:

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;

Cele două asociații au fost supuse studiului principalilor parametri tehnologici, rezultatele căruia sunt prezentate în Tabelul 4.2.

Tabelul 4.2. Caracteristicile asociațiilor de tulpini autohtone pentru brânza

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.

Asociațiile au manifestat caracteristici biotehnologice foarte bune, fermentând laptele de capră în 5,5-6,0±0,5 ore (conform cerințelor durata de fermentare trebuie să fie 7 ore).

Asociația nr.1 manifestă coagularea mai activă a laptelui, comparativ cu asociația nr.2, dar formează un coagul cremos fara eliminarea zerului, calitate nedorită a unei culturii starter pentru fabricarea brânzeturilor. Presupunem ca acest fapt se datorează raportului cantitativ înalt (25%) a tulpinii *S. thermophilus* în cadrul asociației nr.1. În asociația nr. 2 raportul tulpinilor mezofile este mai mare, fapt ce a temperat dezvoltarea dominantă a tulpinii termofile.

Asociația nr.2 se caracterizează prin capacitatea de sinereză activă și aciditate moderată, de aceea ea prezintă interes tehnologic și poate fi utilizată în calitate de cultură starter destinată fabricării brânzeturilor.

În ambele variante aciditatea titrabilă a fost în limitele admisibile – 79-87,5°T, asociațiile formate corespund cerințelor față de culturile starter pentru fabricarea produselor lactate fermentate.

Sinereza are un rol special în procesul de creștere a bacteriilor și activității enzimatice, determinând umiditatea brânzei și, ca rezultat, afectând durata maturării și calitatea brânzeturilor. Rezultatele obținute în urma asocierii speciilor *L. lactis*, *L. cremoris*, *L. lactis biovar diacetylactis* și *S. thermophilus* în cultura starter nr.2, indică sporirea cantității de zer

eliminat, comparativ cu rezultatele obținute la fermentarea laptelui cu tulpini separate, deci s-a demonstrat efectul simbiotic al culturii propuse [167].

De asemenea, s-a efectuat examenul microscopic al culturilor starter elaborate. Rezultatele sunt reprezentate în Figura 4.8.

Prin studiul microscopic al culturilor starter elaborate s-a determinat că în asociația nr.2 celulele tulpinii *S. thermophilus* au format lanțuri lungi, ceea ce demonstrează dezvoltarea activă a culturii, respectiv ea a fost aleasă pentru cercetările ulterioare și numită BriCheese.

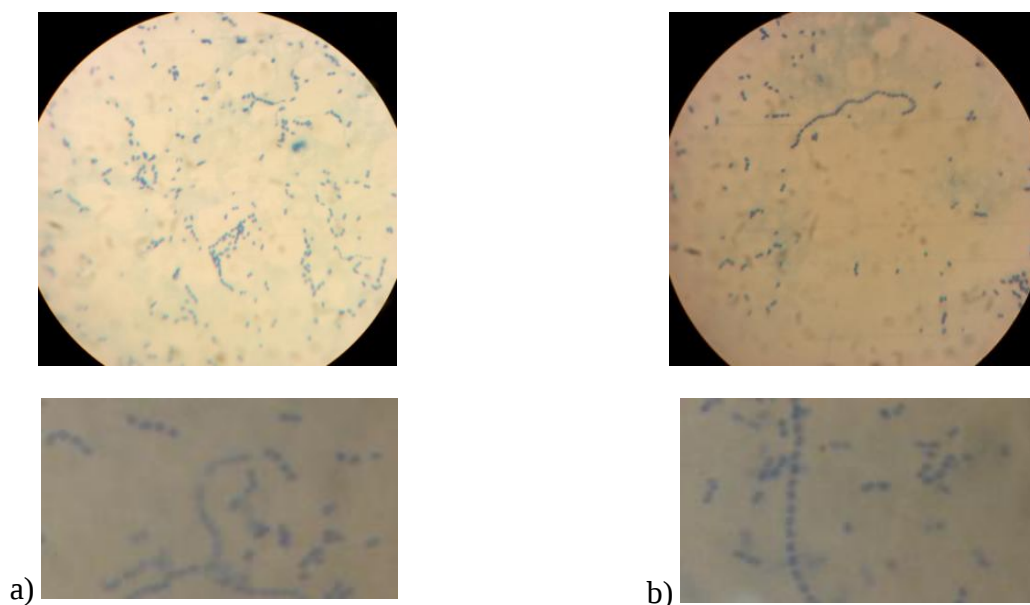


Fig. 4.1. Aspectul microscopic al asociațiilor formate, mărire x100:

a) asociația nr. 1; b) asociația nr.2

(Autorul foto Bogdan N.)

A doua etapă a studiului culturii starter selectate a avut drept scop analiza comparativă a proprietăților biotehnologice valoroase ale culturii starter autohtone elaborate **BriCheese** și a culturii starter de import, pregătită în prealabil din concentrat bacterian CHOOZIT series MA 4001/4002 LYO.

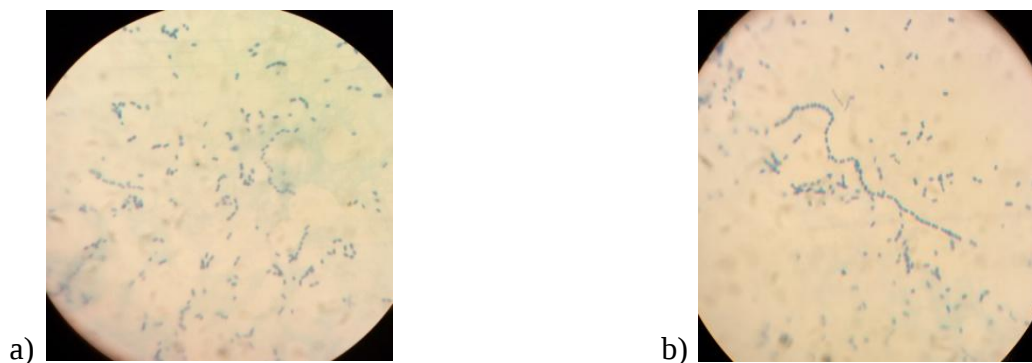
Proprietățile biotehnologice au fost evaluate după 3 pasaje în lapte de capră degresat steril la temperatura optimă de cultivare a culturii mixte mezo-termofile $30\pm 2^{\circ}\text{C}$. Rezultatele cercetărilor sunt prezentate în Tabelul 4.3 și Figura 4.2.

Datele prezentate în tabelul 4.3 caracterizează ambele culturi starter drept culturi cu proprietăți biotehnologice valoroase, utile pentru fabricarea brânzeturilor de tip tari, semi-tari, brânzeturilor cu procesul accelerat de fabricare, și a smântânii, cu aciditatea moderată și conținutul sporit de celule de bacterii lactice viabile.

Tabelul 4.3. Caracteristicile biotehnologice ale culturilor starter pentru brânză

Cultură starter	Caracteristicile biotehnologice			
	NMLV, logUFC/g	Aciditatea titrabilă 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	

Conform cerințelor tehnologice pentru culturile starter destinate fabricării brânzeturilor, durata de coagulare constituie maximum 7,0 ore, rata sinerezei între 2,0-2,5%. Cultura starter elaborată din tulpini autohtone izolate din lapte de capră a manifestat o coagulare mai activă a laptelui de capră în comparație cu cultura de import.

**Fig. 4.2. Aspectul microscopic al culturilor starter, mărire x100:****a) CHOOZIT; b) BriCheese**

(Autorul foto Bogdan N.)

Asociația simbiotică mixtă a tulpinilor de bacterii lactice mezofile și o tulpină termofilă oferă efectul simbiotic al culturii compuse, ceea ce contribuie la obținerea consistenței dense a produsului, cu o sinereză semnificativă. Microflora mezofilă crează un miros clasic, de lapte fermentat, iar dezvoltarea tulpinii *L. lactis biovar diacetylactis* CNMN-LB-73 oferă un gust și aromă plăcută de compuși aromatici mai exprimați decât în cultura CHOOZIT series MA 4001/4002 LYO. Acest fapt prezintă un avantaj pentru fabricarea din lapte de capră a brânzei cu gust și miros ameliorat. Tulpina *L. cremoris* CNMN-LB-78 conferă o nuanță cremoasă ușoară și un gust plăcut produsului, datorită capacității de a forma o cantitate mică de acizi volatili.

Activitatea antagonistă sporită a asociației autohtone constituie 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.

La următoarea etapă a lucrării ne-am propus fabricarea lotului experimental de cultură starter în stare liofilizată destinată fabricării brânzei. Cultura starter autohtonă elaborată a fost inclusă în mediul protector în raport de 1:1 și repartizată în flacoane (cu capacitatea de 10ml) a câte 4 ml. Liofilizarea a fost efectuată la instalația de marca Labconco, conform procedurii elaborat în Laboratorul de Biotehnologii alimentare al IȘPHTA [56]. Au fost obținute 2 loturi experimentale de cultură liofilizată compusă din tulpini autohtone de bacterii lactice pentru brânzeturi. 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 depozitare este important pentru culturile starter. De aceea, după timpul stabilit de păstrare (6 luni de păstrare la temperatura $-18\pm 1^{\circ}\text{C}$) a fost studiat parametrul principal al asociației simbiotice – viabilitatea bacteriilor lactice (Tabelul 4.4.).

Tabelul 4.4. Dinamica numărului de bacterii lactice viabile în procesul de păstrare

		Luni					
Titrul bacteriilor lactice viabile, logUFC în 1 ml	BriCheese	1	2	3	4	5	6
		9,5 $\pm$ 0,3	8,6 $\pm$ 0,1	8,5 $\pm$ 0,3	8,4 $\pm$ 0,1	8,4 $\pm$ 0,2	8,2 $\pm$ 0,1

Din tabel rezultă, 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 culturi starter utilizate la fabricarea produselor lactate fermentate. Procesul verbal de producere a culturii starter în condițiile de laborator se anexează (Anexa 5).

Rezultatele cercetărilor demonstrează, că cultura starter elaborată poate fi, cu siguranță, aplicată în procesul de fabricare a brânzei din lapte de capră. Astfel, această lucrare contribuie la diversificarea asortimentului de brânzeturi - unele din cele mai valoroase produse alimentare.

4.2 Aprecierea calității laptelui de capră - materie primă la fabricarea brânzeturilor

În ultimul timp cerințele pieței de consum privind produsele lactate au sporit semnificativ, inclusiv calitatea și termenele de valabilitate [140]. Din punct de vedere senzorial, fizico-chimic și microbiologic produsele obținute în condiții de stână sau gospodării individuale variază considerabil și în multe cazuri nu prezintă siguranța corespunzătoare cerințelor [12, 18, 22]. Laptele prezintă o sursă naturală pentru obținerea noilor tulpini de bacterii lactice, totuși laptele nu prezintă unicul habitat al bacteriilor lactice, majoritatea acestor microorganisme nimeresc în lapte în procesul mulsului (din pulpa animalului, din băligar, hrană, iarbă, sol, inventar ș.a.), dezvoltarea microorganismelor în lapte se observă și în timpul păstrării și transportării [109, 142].

Problema calității materiei prime pentru fabricarea brânzei este extrem de importantă și este una dintre condițiile principale ce determină calitatea superioară a produsului finit. De aceea, în anul 2015 în Laboratorul de Biotehnologii alimentare a fost elaborat Standardul Moldovenesc care determină specificațiile tehnice privind laptele crud de capră. Cercetările efectuate au fost realizate în conformitate cu reglementările normative [26].

Pentru acest studiu au fost selectate diferite loturi de lapte de capră crud – materie primă, obținute de la „Prietenia Agro” SRL, or. Soroca și „Major-Auto” SRL, or. Taraclia. Mostrele de lapte au fost investigate conform caracteristicilor organoleptice, fizico-chimice și microbiologice, iar rezultatele investigațiilor sunt prezentate în Tabelul 4.5 și Figura 4.3.

Calitatea laptelui - materie primă se apreciază în momentul recepționării prin colectarea probei medii de lapte din fiecare lot de producție și determinarea indicilor organoleptici, fizico-chimici și microbiologici. În funcție de rezultatele acestor analize se face sortarea laptelui, stabilindu-se destinația, fie pentru consum, fie la fabricarea brânzeturilor etc.

Tabelul 4.5. Caracteristicile organoleptice, fizico-chimice și microbiologice a mostrelor de lapte crud

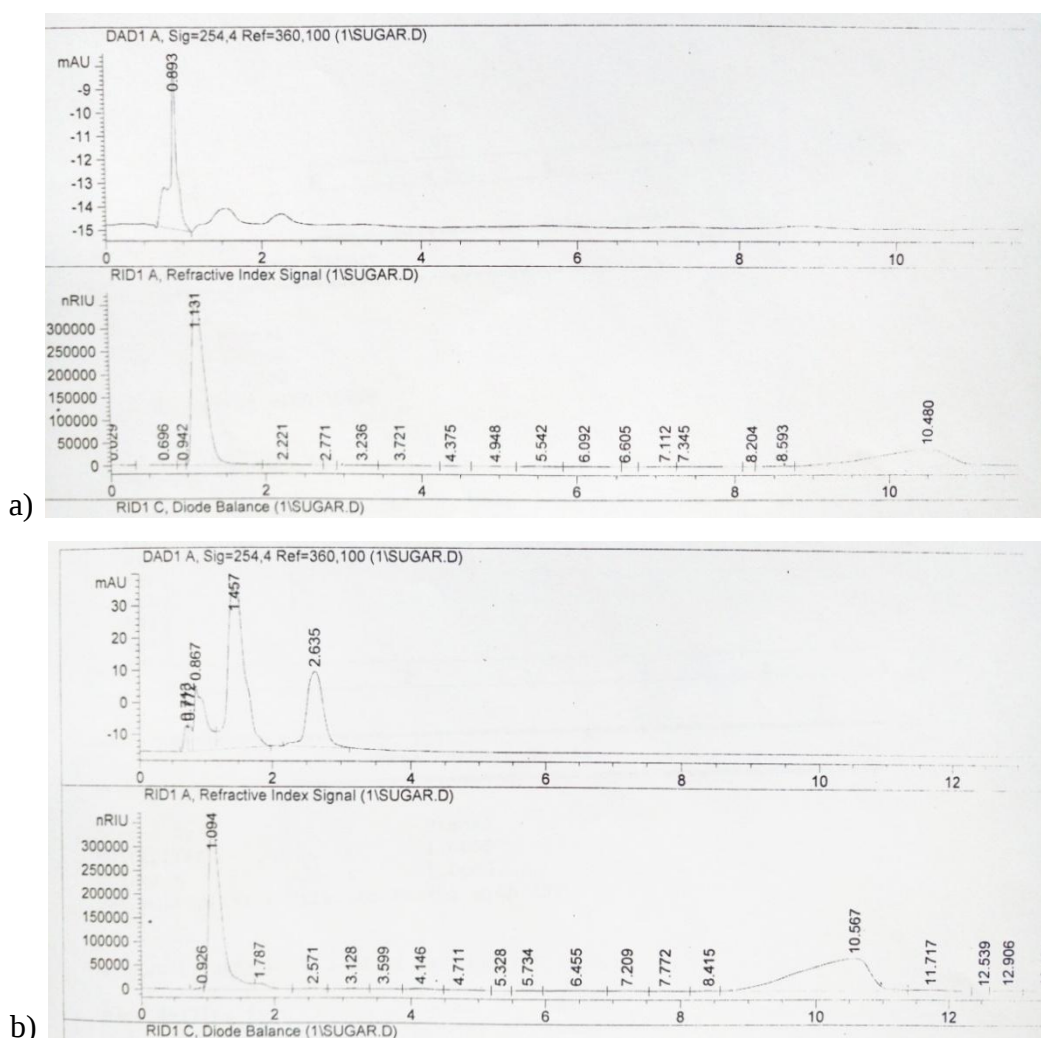
Indicii	Cerinte *	Rezultatele cercetărilor
Indicii organoleptici		
Aspect și consistență	Lichid omogen, fără sediment și flocule	Omogen, curat
Gust și miros	Plăcut, dulce, miros specific laptelui de capră, fără gust și miros străin, se admite miros și gust slab de furaje	Specific laptelui de capră fără gust și miros străin
Culoarea	Alb cu nuanță gălbuie	Alb
Indicii fizico-chimici		
Aciditatea, °T	15-19	17,0±0,70
Densitatea, g/cm ³ , min.	1,030	1,031±0,0028
Fracția masică de grăsime, %, min.	4,0	4,58±0,89
Fracția masică de proteine, %, min.	3,5	4,1±0,11
Fracția masică de substanță uscată degresată (SUD), %, min.	9,0	9,32±0,5
Fracția masică de lactoză, %	4,0-4,6	4,3
Indicii microbiologici		
Numărul de microorganisme mezofile aerobe și facultativ anaerobe (NMMAFA), UFC/cm ³ , max.	1,0 × 10 ⁵	5,4±1,9×10 ³
Conținutul de <i>Salmonella</i> , în 25g/produs	nu se admite	nu s-a depistat
Numărul de celule somatice la 1cm ³ , max.	2,0 × 10 ⁵	1,1±0,2 × 10 ⁵
<i>Listeria monocytogenes</i>	nu se admite	nu s-a depistat

Notă: * conform SM 317: 2015 “Lapte crud de capră și oaie. Specificații” [26].

Determinarea indicilor fizico-chimici ai laptelui de capră în calitate de materie primă a fost efectuată cu utilizarea analizatorului automat al laptelui EKOMILK Total Bulteh 2000 și prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) conform metodei standardizate ISO 22662:2007 prin detectare refractometrică, care exprimă rezultatele maximal corect.

Se știe că în unele cazuri laptele de capră conține fracția masică de lactoză mai înaltă, comparativ cu același indicator în laptele de vacă, dar dimensiunile acesteia în laptele de capră sunt mai mici și lactoza laptelui de capră este mai intens scindată de enzima lactaza (β -galactozidaza), produsă de microflora culturii starter. Aceasta determină oportunitatea utilizării laptelui de capră pentru alimentația dietetică și pentru copii [149, 172].

Rezultatele referitoare la conținutul de lactoză în laptele de capră, determinat prin cromatografie lichidă (HPLC), sunt prezentate în Figura 4.3.



**Fig. 4.3. Cromatografie lichidă (HPLC): a) Cromatograma soluției standard de lactoză;
b) Cromatograma probei de lapte de capră-materie primă**
(Autorul foto Bogdan N.)

Se cunoaște, că compoziția chimică a laptelui de capră diferă în funcție de sezon, furajare, vârstă, perioada de lactație, și că aciditatea (prospețimea) laptelui este mai sporită în perioada de vară, influențată de temperatura mediului înconjurător [16, 35, 127, 168]. Conținutul sporit de substanță uscată degresată indică faptul că laptele este valoros din punct de vedere tehnologic pentru procesare, iar fracția masică de proteine în valoare de 4,1 % este favorabilă procesării pentru obținerea brânzei.

Conform cerințelor stipulate în documentul normativ pentru laptele crud de capră, putem constata că mostrele de lapte corespund cerințelor tehnice de calitate care oferă oportunitatea de a aprecia și accepta calitatea laptelui de capră obținut de la producător și va permite obținerea unui produs de calitate și siguranță garantată.

Rezultatele cercetărilor efectuate au contribuit la elaborarea Standardului de Firmă 38930262-001:2015 și Instrucțiunii Tehnologice 67-38930262-001:2015 SRL „Prietenia-Agro” or. Soroca pentru fabricarea laptelui de capră de consum pasteurizat, avizate de către Centrul Național de Sănătate Publică și Agenția Națională pentru Siguranța Alimentelor. Certificatul de implementare a tehnologiei pentru fabricarea laptelui de capră de consum pasteurizat este prezentat în Anexa 6.

4.3 Includerea culturii starter elaborate în procesul tehnologic de fabricare a brânzei

Brânza prezintă un produs tradițional, datorită valorii nutritive și biologice sporite și gradului înalt de digerabilitate. În fabricarea brânzeturilor intervin numeroase influențe, care determină marea diversitate de brânzeturi cunoscute în prezent. Unele sortimente noi de brânzeturi sunt consecința cercetărilor științifice recente, altele au evoluat datorită noilor tehnologii asimilate în producție.

Producția și consumul de brânzeturi este în creștere, această tendință se va menține și pentru viitor. Printre direcțiile principale de dezvoltare a industriei brânzeturilor cităm: perfecționarea tehnologiilor de fabricare prin intermediul mecanizării și automatizării proceselor tehnologice; reducerea duratei de maturare a brânzeturilor; folosirea rațională a tuturor componentelor materiei prime [16, 140].

Tradițional, în Republica Moldova, din lapte de capră se prepară brânzeturi sărate sau în saramură de tip telemea sau feta (în traducere din turcă și greacă înseamnă felii-bucăți), obținute prin coagularea laptelui crud cu ajutorul enzimelor coagulante de origine animală sau microbiană. Procesul tehnologic de fabricare a acestor brânzeturi are multe operații comune cu

celelalte tipuri de brânzeturi. Deosebirea principală constă în faptul că maturarea (și păstrarea brânzeturilor) are loc în saramură.

Trebuie menționat faptul, că laptele și produsele lactate sunt cele mai frecvente surse de contaminări bacteriene alimentare, cu cea mai mare răspândire a intoxicațiilor alimentare stafilococice.

În industria laptelui, sursa principală de stafilococci patogeni este laptele crud. Conform diferitor autori, cantitatea lor medie variază între 1 și 5×10^4 UFC/ml.

Din această cauză este tot mai actuală necesitatea evitării contaminării laptelui crud. Există multe studii care au dovedit eficacitatea procesului de pasteurizare împotriva bacteriilor patogene și condiționat patogene din lapte [137].

Luându-se în considerație factorii de risc din gospodăriile individuale, stâne și anume nivelul scăzut de respectare a cerințelor igienice și sanitare de întreținere a animalelor și respectiv de obținere a laptelui crud, s-a elaborat schema tehnologică de producere în condiții de mini-întreprindere a brânzeturilor din lapte pasteurizat de capră cu aplicarea bacteriilor lactice selecționate și a enzimelor coagulante industriale, care asigură obținerea produsului finit de calitate și siguranță garantată, cu termen de maturare mai scurt, comparativ cu brânzeturile obținute din lapte crud.

Există mai multe procedee de fabricare a brânzeturilor, care influențează indicatorii de determinare a brânzei ca produs finit. Pentru fabricarea brânzei clasice și grase se preferă coagularea laptelui cu aplicarea cheagului și maielei de bacterii lactice [175].

Pentru a obține brânza sub formă de produs autohton, a fost utilizată tehnologia tradițională de coagulare a proteinei cu cheag și maia. Indicatorii tehnico-economici și calitatea coagulului în acest caz sunt mult mai buni decât la aplicarea metodei acide: coagulul are o structură mai compactă, domină particule de dimensiuni mari de 30-50 microni (până la 45,8%), în timp ce prin coagulare acidă predomină particule mici de 10 microni (până la 55%); aplicarea enzimei de cheag reduce pierderea de grăsimi; durata fermentării este redusă cu 2 ore, iar din punct de vedere al caracteristicilor organoleptice brânza obținută prin această metodă, obține un gust plăcut și mai delicat [166].

Consumul de materie prime la fabricarea a 100 kg de brânză se consideră consumul real (de facto) de materie primă utilizată, care nu depășește normele stabilite de întreprinderea producătoare.

Consumul de lapte utilizat la fabricarea brânzei se calculează în funcție de fracția masică de grăsime a laptelui de capră, care variază între 3,6 % și 4,5%, luând în considerație pierderile de grăsime, și se calculează după formula 4.1:

$$C = \frac{G_c \cdot (100 - W) - G_z}{(1 - 0,01P) \cdot G_l - G_z} \quad (4.1)$$

Unde:

C – consumul de lapte, kg la 100 kg de brânză;

G_c – fracția masică de grăsime în substanță uscată a brânzei, %;

W – fracția masică de umiditate în brânză, %;

G_z – fracția masică de grăsime în zer, %;

P – pierderile de grăsime pe tot ciclul de fabricație, %;

G_l – fracția masică de grăsime a laptelui, %

Pentru fabricarea 100 kg de brânză se utilizează 700 kg de lapte de capră.

Norma eliminării zerului la fabricarea brânzei constituie 65-70%.

Pentru aceasta au fost calculate rețetele de fabricare a brânzei din lapte de capră, care sunt prezentate în Tabelul 4.6.

Tabelul 4.6. Rețete de producere a brânzei (pentru 100 kg de produs finit fără evidența pierderilor)

Materie primă	La 100 kg brânza
Lapte de capră 4,3% cu grăsime, l	700
Cultură starter reactivată, l	7,0
Clorură de calciu, kg	0,175
Enzimă coagulantă, kg	0,0175

În condiții industriale în cadrul SRL “Major-Auto”, or. Taraclia, a fost elaborată tehnologia pentru fabricarea brânzei din lapte de capră conform Standardului de Firma SF 40388050-001:2017 și Instrucțiunii Tehnologice IT MD 67- SF 40388050-001:2017 (Anexa 7). Certificatul de implementare a tehnologiei este prezentat în Anexa 8.

Procesul tehnologic de fabricare a brânzei din lapte de capră consta din următoarele operații:

Recepționarea laptelui.

Calitatea laptelui - materie prima destinată fabricării brânzei se apreciază conform conținutului de grăsime și proteină totală, indicilor organoleptici și microbiologici.

Pentru pregătirea brânzei se utilizează numai lapte „indicat pentru brânzeturi”, adică lapte cu conținutul normal de substanțe nutritive, fără defecte de ordin organoleptic, fizico-chimic sau microbiologic, cu cerințele stabilite către SM 317: 2015 “Lapte crud de capră și oaie. Specificații” [26].

După recepționarea și aprecierea cantitativă și calitativă, în vederea îndepărtării impurităților mecanice, laptele se curăță prin centrifugare.

Rezervarea și maturarea laptelui.

Laptele proaspăt curățat se menține la temperatura $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pentru maturare timp de 10-15 ore, ca urmare are loc creșterea acidității titrabile a laptelui cu $1-2^{\circ}\text{T}$. Temperatura optimă a laptelui rezervat – $4-5^{\circ}\text{C}$. Se presupune că utilizarea laptelui maturat reduce timpul obținerii produsului finit [140].

Pasteurizarea laptelui.

Laptele de capră pentru fabricarea brânzei se pasteurizează în instalația de pasteurizare de tip cadă cu pereți dubli la temperatura de $65-68^{\circ}\text{C}$ timp de 20-30 min. Dacă întreprinderea dispune de pasteurizatoare cu plăci sau tubulare, pasteurizarea se realizează la temperatura de $72-74^{\circ}\text{C}$ timp de 15-20 sec. Acest regim de pasteurizare permite distrugerea microflorei vegetative și provoacă modificări minime în compoziția și proprietățile laptelui. De asemenea, pentru a îmbunătăți calitatea și siguranța laptelui crud s-a stabilit că tratarea termică a laptelui de capră la o temperatură de peste 70°C contribuie la sporirea disponibilității proteinelor pentru acțiunea principalelor proteaze gastrointestinale (pepsină, tripsină), crescând digestibilitatea acestora și reducând alergenitatea [128, 141].

Răcirea laptelui.

Laptele, imediat după pasteurizare, se răcește până la temperatura de coagulare $32-35^{\circ}\text{C}$. Apoi laptele se transmite nemijlocit la prelucrare.

Introducerea maielei.

Pentru a obține un produs de calitate înaltă, cu consistență, gust și aromă corespunzătoare, este important de acordat atenția cuvenită aplicării culturilor de bacterii lactice, care asigură o fermentare dirijată a laptelui. După răcirea laptelui până la temperatura de coagulare, în amestec se introduce maioua bacteriană în cantitate de la 0,4 până la 1,5% în dependență de sezon și aciditatea laptelui utilizat, sau conform recomandărilor firmei producătoare. În cazul fabricării brânzeturilor prin metoda accelerată se adaugă cultura starter mixtă (mezo-termofilă) în cantitate de până la 10%.

După agitare, amestecul lapte-maia se lasă pentru maturare timp de 30-40 min până la obținerea acidității 24-25°T a laptelui de capră.

Introducerea sărurilor de calciu.

Sărurile de calciu au o influență decisivă asupra coagulării cazeinei, o cantitate insuficientă de calciu determină obținerea unui coagul moale, ce reține o cantitate mare de zer și duce la pierderi considerabile de cazeină.

Dacă în lapte se conține o cantitate suficientă de calciu, procesul de coagulare decurge rapid, obținându-se un coagul dens, în caz contrar procesul de coagulare e mai lent, coagulul fiind moale și în procesul de prelucrare trece multă cazeină în zer.

Deoarece în procesul pasteurizării are loc precipitarea calciului, pentru restabilirea lui în laptele pasteurizat întotdeauna se adaugă CaCl_2 . Procesul dat are scopul de a restabili conținutul de calciu precipitat parțial în timpul pasteurizării și capacitatea de coagulare a laptelui.

În laptele maturat se introduce CaCl_2 în cantitate de 10-25 g la 100 l și enzimă coagulantă într-o cantitate necesară pentru a obține coagularea în 60-70 min. Coagulul trebuie să fie dens și ferm. Procesul dat are scopul înlocuirii microflorei inițiale distruse prin pasteurizare, cu microorganisme care determină transformări dorite în lapte, coagul și în brânză.

Coagularea laptelui.

Coagularea laptelui este o etapă de bază a procesului tehnologic de fabricare a brânzei.

Procesul de coagulare constă în trecerea cazeinei în paracazeină sub acțiunea enzimelor coagulante (faza fermentativă) și formarea structurii coagulului pe baza precipitării paracazeinei sub acțiunea ionilor de calciu (faza coloidală).

După amestecare, în lapte se introduce preparatul de închegare (enzima) a laptelui într-o cantitate necesară pentru a obține coagularea în timp de 40-90 minute la temperatura de la 32 până la 34°C. Laptele se amestecă minuțios, apoi se lasă în repaos până la formarea coagulului.

Finalizarea procesului de coagulare se determină după caracterul coagulului, care trebuie să fie potrivit de dens și se sparge la agitare. Zerul eliminat trebuie să fie transparent, de culoare verzuie-deschisă. Durata optimă de închegare este de 30-35 min.

Prelucrarea coagulului și formarea bucăților de brânză.

Procedeele tehnologice acordă o atenție specială fazei de prelucrare a coagulului pentru eliminarea zerului în cantități corespunzătoare sortimentului de brânză dorit, deoarece de aceasta depinde conținutul final de umiditate al brânzei.

Coagulul obținut se taie și se lasă în repaos timp de la 10 până la 20 minute pentru întărire. Se elimină până la 50% zer față de amestecul inițial (brânzeturi tari). Masa de coagul se trece pe masa de scurs acoperită cu sedilă.

Formarea brânzei.

Coagulul obținut, bine scurs, se introduce în forme cilindrice cu fundul perforat, acoperite cu sedilă, curate și dezinfectate. După punerea în forme, masa de coagul se leagă cu sedilă, care după 5 minute se desface din nou și se desprind marginile masei de coagul de sedilă pentru a favoriza scurgerea zerului. Procesul de autopresare se efectuează timp de 80-120 minute la temperatura de 16-18°C. Masa coagulului obținut după autopresare în forme se direcționează la sărare.

Sărarea brânzei.

Sărarea se realizează prin menținerea bucăților de brânză timp de 14-16 ore în saramură cu concentrația 20-22 % de sare. Durata sărării uscate este până la 24 ore.

Maturarea și ambalarea brânzei.

Brânza sărată și acoperită cu saramură se transmite în camera de maturare. Temperatura de maturare a brânzei sărate trebuie să fie în limitele de la 14 până la 18°C, umiditatea relativă a aerului max. 90%. Durata de maturare constituie de la 20 până la 30 zile. După maturare bucățile de brânză urmează să fie ambalate.

Ambalarea sub vid previne dezvoltarea mușgaiului, reduce eliminarea apei, obținându-se un produs de calitate sigură.

Păstrarea și transportarea produsului finit.

Durata păstrării brânzei este de 4 luni în depozite simple la temperatura 10-12 °C și până la 12 luni în camere frigorifice la temperatura 4-6 °C.

Transportarea produsului trebuie să fie efectuată în conformitate cu cerințele standardului de firmă în vigoare.

În baza elaborărilor efectuate, în condiții industriale ale întreprinderii SRL "Major-Auto", or. Taraclia, a fost produs un lot experimental de brânză din lapte de capră, folosind cultura starter elaborată din 5 tulpini studiate: *L. lactis biovar diacetylactis* CNMN-LB-73, *L. lactis* CNMN-LB-74, *L. lactis* CNMN-LB-75, *L. cremoris* CNMN-LB-78, *S. thermophilus* CNMN-LB-79. Certificatul de implementare a culturii starter este prezentat în Anexa 9. În rezultatul implementării s-a constatat că tulpinile autohtone asigură fermentarea activă a laptelui de capră și atingerea nivelului necesar de aciditate conform cerințelor pentru fabricarea brânzeturilor.

Materia primă utilizată în procesul de fabricare a brânzei a fost laptele de capră cu parametri fizico-chimici după cum urmează: aciditatea titrabilă $16 \pm 1^{\circ}\text{T}$, aciditatea activă pH $6,40 \pm 0,5$, fracția masică de grăsime $4,2 \pm 0,5\%$, fracția masică de proteine $3,9 \pm 0,1\%$, fracția masică de substanță uscată degresată (SUD) – $9,6 \pm 0,2\%$, fracția masică de lactoză – $4,3 \pm 0,1\%$, iar caracteristicile organoleptice ale laptelui fiind: după aspectul exterior și consistență – lichid omogen netransparent, fără sediment și flocoane, cu gust și miros pur, specific laptelui de capră proaspăt; culoare – albă, cu nuanță gălbuie, uniformă în toată masa. Materia primă a fost selectată în conformitate cu Reglementarea tehnică „Lapte și produse lactate”.

Se știe că aplicarea bacteriilor lactice izolate din laptele de capră pentru fermentarea laptelui de capră contribuie la sporirea valorii biologice și nutritive a produsului finit [100, 128]. În acest sens, este important de a verifica modul în care funcționează culturile la scară industrială de fabricare a produselor lactate fermentate [116].

Deci, în toate loturile a fost introdusă cultura starter în cantitate de 1%. Procesul de fermentare a laptelui a durat până la atingerea acidității titrabile 25°T . După finalizarea procesului de fermentare s-a introdus sarea de calciu și o enzimă coagulantă de origine microbiologică „Fromase” (Danisco). Procesul de coagulare a durat 40 min. În continuare brânzeturile obținute au fost supuse sărării, maturării și păstrării conform tehnologiei elaborate. Au fost studiate proprietățile senzoriale, fizico-chimice și microbiologice ale brânzei obținute.

Cultura starter a fost propusă pentru brevetare: „Procedeu de obținere a brânzei din lapte de capră” [7]. Copia brevetului de invenție și distincțiile obținute la expozițiile internaționale de invenție pentru această elaborare sunt prezentate în Anexa 10.

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

Conform documentelor tehnico-normative brânză ca produs finit trebuie să corespundă anumitor parametri organoleptici, fizico-chimici și microbiologici [18, 166]. Evaluarea calității brânzei fabricate în condiții industriale cu utilizarea culturii starter, elaborate în cadrul tezei de doctorat, a fost inițiată prin studiul caracteristicilor organoleptice: consistența, aspectul exterior, gustul, mirosul, culoarea și textura brânzei.

Caracteristicile organoleptice ale mostrelor de brânză fabricată a fost evaluată la Comisia de degustare din cadrul Direcției „Tehnologii Alimentare” a IP IȘPHTA, fapt confirmat prin procesul verbal de degustare (Anexa 11).

Fiecare degustător a evaluat calitățile senzoriale ale brânzei, 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 4.4.

Brânza fabricată cu aplicarea culturii starter a fost caracterizată astfel: coagulul de consistență densă, textura nesfărâmicioasă, 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.

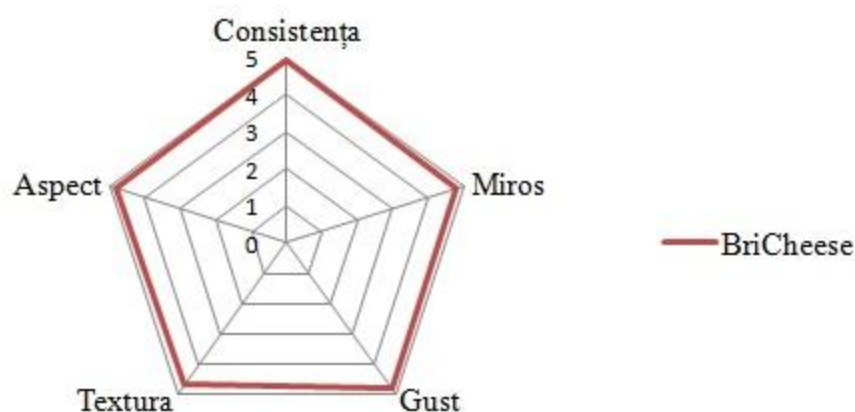


Fig. 4.4. Profilul senzorial al brânzei din lapte de capră cu aplicarea culturii BriCheese

Astfel, proprietățile organoleptice ale brânzei fabricate cu utilizarea culturii starter BriCheese ce conține tulpinile *L. lactis biovar diacetylactis*, *L.lactis*, *L. cremoris*, *S. thermophilus* au fost apreciate pozitiv și au obținut rezultate bune.

Au fost studiate caracteristicile fizico-chimice de calitate ale mostrelor de brânză fabricată. Rezultatele sunt reprezentate în Tabelul 4.7.

Tabelul 4.7. Caracteristicile fizico-chimice ale mostrelor de brânză

Indicii	Cerințe *	Brânza din lapte de capră
Fracția masică de grăsime în substanța uscată, %	min.40	46,3
Fracția masică de umiditate, %	30,0-55,0	53,1
Fracția masică de NaCl, %	1,5 – 4,0	3,5

Notă: * [18].

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%.

A fost apreciată evoluția numărului de microorganisme lactice și scăderea acidității active în procesul de maturare și în produsul finit. Datele obținute sunt prezentate în Figura 4.5.

Brânza fabricată cu utilizarea culturii starter BriCheese a demonstrat prezența unui număr mai mare de celule lactice $8,6 \pm 0,02$ lg UFC în 1 g de probă. Proprietățile deosebite ale culturii starter din tulpini autohtone de bacterii lactice sunt confirmate prin brevetul de invenție de scurtă durată MD 1299 Y 2019.01.31 „Procedeu de obținere a brânzei din lapte de capră” [7] (Anexa 10).

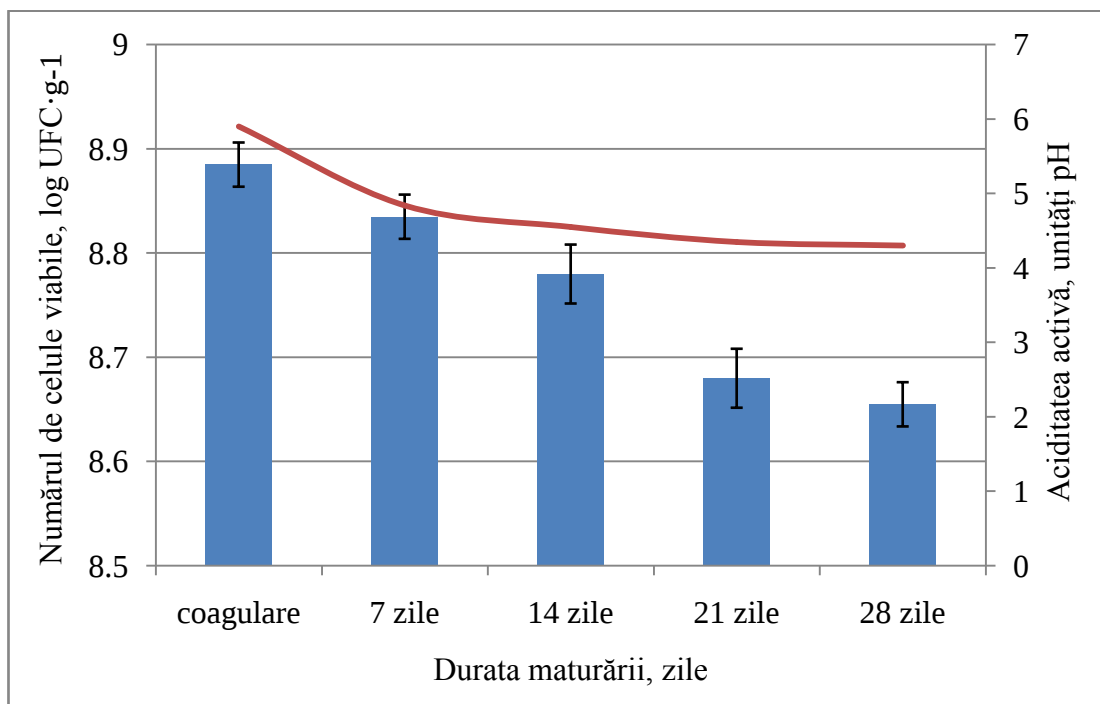


Fig. 4.5. Modificarea acidității active și numărului de bacterii lactice pe parcursul maturării brânzei din lapte de capră

Numărul de celule viabile a bacteriilor lactice a fost menținut pe toată perioada de maturare a brânzei. În termen de 10 zile de maturare, numărul maxim de bacterii lactice a atins 8,85 unități logaritmice, apoi a început să scadă, ceea ce era de așteptat. 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 produsul lactat cu microorganisme benefice din abundență. Din datele prezentate rezultă că la finalizarea procesului de maturare a brânzei, numărul celulelor lactice în mostre a rămas la un nivel mai ridicat (8,65 unități logaritmice) comparativ cu rezultatele raportate de alți autori [98].

Aciditatea activă a mostrelor de brânza obținută a scăzut în prima săptămână de maturare de la 5,9 până 4,8, iar valoarea finală a acidității active în produs a avut un pH-4,1. Evoluția

acidității active este legată de acumularea lentă a acidului lactic de către cultura starter BriCheese pe parcursul procesului de maturare a brânzei, ceea ce confirmă rezultatele obținute de alți autori [103].

Aciditatea activă și numărului de bacterii lactice în produsul finit nu s-a schimbat mult comparativ cu valorile inițiale, de aceea putem concluziona că valorile finale ale mostrelor de brânză corespund exigențelor Reglementării Tehnice „Lapte și produse lactate”.

Mostrele de brânză au fost evaluate privind caracteristicile microbiologice. Datele sunt expuse în Tabelul 4.8.

Tabelul 4.8. Caracteristica microbiologică a mostrelor de brânză

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
Microorganisme lactice viabile, UFC/g, min	1×10^8
Microorganisme mezofile aerobe și facultativ anaerobe (NMMAFA), UFC/g, max	nu se normează

Mostrele de brânză obținute corespund cerințelor indicate în „Reguli privind criteriile microbiologice pentru produse alimentare” [17].

Datorită particularităților procesului tehnologic de producție, brânza, fiind un mediu favorabil pentru dezvoltarea microorganismelor, are un termen de valabilitate scurt. Prin urmare, studiile de îmbunătățire a tehnologiei acestui produs vizează îmbunătățirea calității și prelungirea termenului de valabilitate, ceea ce poate fi atins prin metode biotehnologice, în acest caz prin adăugarea unei culturi starter valoroase [139, 140].

Produsele lactate cu termenul de păstrare îndelungat prezintă un avantaj pentru industria laptelui din Republica Moldova fiindcă asigură populația țării cu produse lactate calitative și sigure, care ar putea fi direcționate și spre export.

În scopul stabilirii termenului de păstrare a brânzeturilor, fabricate în condiții industriale, mostrele din loturile experimentale au fost depuse la păstrare pe un termen de 90 zile. Prelungirea investigațiilor a fost determinată ținând cont de coeficientul de rezervă. Pentru produsele cu termen de păstrare de peste 30 de zile el constituie 1,2. Conform metodelor utilizate în domeniul alimentar [156], brânzeturile au fost păstrate la două regimuri de temperatură $4 \pm 2^\circ\text{C}$ și $9 \pm 2^\circ\text{C}$ timp de 108 zile. 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 și microbiologici. Numărul analizelor

periodice ale 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 analizei senzoriale, fizico-chimice și microbiologice pentru o mostră de brânză din lapte de capră sunt prezentate în tabelul 4.9. Darea de seamă privind termenul de păstrare este prezentat în Anexa 12. Din datele Tabelului 4.9 se observă, că pe parcursul termenului de păstrare caracteristicile organoleptice ale mostrelor de brânză nu s-au înrăutățit în comparație cu nivelul inițial de fabricare.

Tabelul 4.9. Dinamica indicilor de calitate pe parcursul termenului de valabilitate a brânzei

Indici	Periodicitatea, zile				
	1	36	72	90	108
Aspect exterior și consistență	Bucăți cilindrice, fără coajă, cu urme de sedilă, cu suprafața curată. Consistență omogenă, densă, elastică, nesfărâmițoasă. Desen din ochiuri și goluri de formă neregulată, repartizate în toată masă				
Culoarea	Albă, uniformă în toată masa				
Gust și miros	Caracteristic laptelui de capră, sărată. Fără gust și miros străin. Gust plăcut, îmbogățit				
Fracția masică de grăsime în substanța uscată, %	46,3±0,2	46,7±0,1	46,9±0,1	47,0±0,1	47,2±0,2
Fracția masică de umiditate, %	53,1±0,1	53,0±0,1	52,9±0,1	52,4±0,2	51,8±0,1
Indice de aciditate, mg KOH/g	3,8	3,8	3,8	3,9	3,9
Microorganisme lactice viabile, UFC în 1g produs	1x10 ⁸	1x10 ⁸	1x10 ⁸	1x10 ⁸	1x10 ⁷
NMMAFA, în 1g produs	1,3x10 ³	1,7x10 ⁴	2,0x10 ⁴	2,1x10 ⁴	2,5x10 ⁴
<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				
Bacterii coliforme, în 0,01g produs	Nu s-a depistat				

Indicii fizico-chimici ai mostrelor de brânză practic nu s-au schimbat pe parcursul perioadei de păstrare (cu variații neînsemnate în limitele erorii admise) și corespund cerințelor documentelor normative în vigoare [18].

În rezultatul cercetărilor microbiologice ale mostrelor pe parcursul perioadei de păstrare, se poate afirma că nici într-o probă de brânză nu au fost depistate microorganisme patogene, inclusiv bacterii coliforme, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, bacterii din genul *Proteus*. Microorganismele aerobe mezofile și facultativ anaerobe în mostrele de brânză, nu se normează, și pe parcursul perioadei de cercetare s-au depistat în cantități neînsemnate.

Numărul de bacterii lactice în mostre, pe parcursul termenului de cercetare (5 puncte de control, 108 zile de păstrare) a rămas în limitele cerințelor normative - nu mai mic de 10^7 celule bacteriene.

Rezultatele cercetărilor au demonstrat, că cultura starter utilizată în procesul de fabricare a brânzei din lapte de capră influențează semnificativ caracteristicile senzoriale, organoleptice și indicii de calitate ai produsului finit. Radulovic, Z. (2011) după cercetări proprii au ajuns la concluzia că compoziția chimică a brânzeturilor obținute cu diferite culturi starter industriale nu au diferențe semnificative. Pe când tulpinile autohtone de bacterii lactice aplicate în culturi starter pentru producerea brânzeturilor sunt importante pentru obținerea unor caracteristici senzoriale specifice, tipice pentru brânzeturile tradiționale [98].

Datorită aplicării culturii starter din tulpini autohtone cu proprietăți antimicrobiene sporite, s-a obținut un produs de calitate înaltă cu caracteristici organoleptice îmbunătățite și cu o durată de păstrare îndelungată, fără a compromite siguranța produsului finit (peste 90 de zile) [51].

Aceste rezultate confirmă valoarea tulpinilor autohtone din punct de vedere a proprietăților biotehnologice și microbiologice, care au permis obținerea brânzei cu termen de păstrare mai îndelungat comparativ cu brânza descrisă de alți autori, de ex. brânza obținută prin adăugarea lactoferinei cu efect antimicrobian care a avut termen de păstrare până la 30 zile [139].

Rezultatele obținute au demonstrat avantajele valorificării tulpinilor microbiene izolate din lapte de capră în procesarea industrială a laptelui de capră:

1. Utilizarea laptelui de capră contribuie la diversificarea tehnologiilor de procesare a materiei prime și sortimentului produselor lactate autohtone calitative și sigure.
2. Utilizarea culturii starter obținute prin asocierea tulpinilor autohtone *L. lactis*, *L. cremoris*, *L. diacetylactis*, *S. thermophilus*, adaptate la calitatea materiei prime și selectate după proprietăți antagoniste față de *E. coli* și *S. aureus*, permite ameliorarea gustului produsului, sporirea siguranței alimentare și prelungirea termenului de valabilitate a produsului finit.
3. Brânza obținută se caracterizează prin coagul dens (cu pierdere minimă de proteine la tăiere), consistență nesfărâmicioasă, moale și conținut înalt de bacterii lactice viabile care au efect benefic asupra sistemului digestiv al omului.

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

Astăzi pe teritoriul Republicii Moldova sunt înregistrate numai câteva mini-întreprinderi de procesare a laptelui de capră. Ca rezultat al diversificării gamei de produse din lapte de capră crește și cererea în culturi starter.

Utilizarea culturilor starter în industria laptelui permite intensificarea procesului de fermentație, reduce spațiile de producere și îmbunătățește siguranța alimentară a produsului [171].

Rezultatele cercetări indică faptul că culturile starter preparate din tulpini autohtone de bacterii lactice pot fi utilizate cu succes în producția brânzeturilor.

În prezent, culturile starter sunt obiecte de import pentru Republica Moldova, dar cheltuielile legate de import contribuie la majorarea prețului produsului finit.

Pentru a aprecia fezabilitatea economică a fabricării brânzei din lapte de capră este necesar de a calcula costul concentratului bacterian implementat în procesul tehnologic de preparare a brânzei.

La prima etapă s-a efectuat calculul estimativ al costurilor pentru concentrat bacterian, care se realizează după următoarele articole de calcul:

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 din 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. Calculele privind consumul, costul materiei prime și a materialelor de bază pentru fabricarea culturii starter pentru brânză sunt prezentate în Tabelul 4.10 și 4.11.

Cheltuielile de transport includ costul de transport al materiei prime. Valoarea lor este estimată aproximativ la 15-20% din costul materiei prime. Cheltuielile de transport reprezintă 16,3 lei. Cheltuielile legate de combustibil și consumul de energie în scopuri tehnologice

(energie electrică, apă etc.) sunt calculate în funcție de normele relevante ale cheltuielilor de echipament tehnologic în valoare de 15-20% din costul materiei prime și a materialelor de bază. Cheltuieli de combustibil și consumul de energie în scopuri tehnologice constituie 16,3 lei.

Tabelul 4.10. Calcularea consumului materiei prime și materialelor de bază pentru obținerea 1 kg concentrat bacterian

Materie primă și materiale	Consum, kg	Costul, lei
Lapte de capră	10,000	32,0
Separare	80Wt	10,0
Mediul pe bază de lapte de capră degresat hidrolizat	10,000	278,0
Cultivare, centrifugare	20kWt	50,0
Total		370,0

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

Materie primă și materiale	Consum, kg	Costul, lei
Lapte de capră degresat	1,000	85,0
Citrat de sodiu	0,9	1,0
Soluție tampon	0,1	15,0
<i>Lactococcus lactis</i>	0,0030	3,0
<i>Lactococcus cremoris</i>	0,0015	1,5
<i>Lactococcus lactis biovar diacetylactis</i>	0,0015	1,5
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0,0015	1,5
Total		108,5

Consumul materialelor auxiliare includ costul produselor chimice, textile, lubrifianti, containere, detergenți, echipamente, materiale de ambalare care sunt necesare pentru producerea unei unități de produs. Calculul este prezentat în Tabelul 4.12.

Tabelul 4.12. Consumul materialelor auxiliare

Materiale auxiliare	Consum, buc	Prețul, lei	Costul, lei
Cutie	1	19	19,0
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
Total		38,86	969,0

Mărimea salariului de bază și suplimentar al lucrătorilor subdiviziunii de producere este determinată prin extinderea la o rată de 8-15% din costul materiei prime și constituie până la 8,7 lei. Contribuțiile sociale includ următoarele taxe reținute: fondul social 23%, asigurare medicală 9%, fondul de asigurare socială 6% și constituie 3,3 lei.

Cheltuielile pentru întreținerea și funcționarea echipamentului s-a determinat prin extinderea în mărime de 30-50% din fondul de salarii al lucrătorilor subdiviziunii de producere și constituie 3,5 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 3,9 lei.

Cheltuielile de producere generale includ costurile de gestionare și organizarea producerii la întreprindere. Aceste cheltuieli sunt la o rată de 150-200% din salariul lucrătorilor de producție. Cheltuielile de producere generale constituie 13,05 lei.

Costul unitar de producție este definit ca suma tuturor acestor articole și constituie 1496,25 lei.

Costurile ocazionate în afara producției includ cheltuielile legate de vânzare a produselor finite și se calculează cu extinderea de 0,1-0,5% din costul de producție, ce constituie 1,3 lei.

Costul total (sinecostul) include suma costurilor de producție și în afara producției și constituie 1497,55 lei.

Calculând costul total și stabilind nivelul de rentabilitate se poate calcula profitul și prețul en-gros al produsului.

Nivelul mediu de rentabilitate al întreprinderilor din industria alimentară este aproximativ de 15-25%. Astfel, câștigul estimat (C) se calculează după formula 4.2:

$$C = \frac{S \cdot R}{100} \quad (4.2)$$

unde:

S – sinecostul produsului, lei;

R – nivelul de rentabilitate, %.

$$C = \frac{1497,55 \cdot 25}{100} = 374,4 \text{ lei}$$

Prețul en-gros se determină după formula 4.3:

$$P = S + C \quad (4.3)$$

$$P = 1497,55 + 374,4 = 1871,9 \text{ lei}$$

Astfel, costul aproximativ a unui flacon (2 g) de concentrat bacterian pentru fabricarea brânzei constituie 3,74 lei.

Prețul concentratului bacterian obținut, în mediul optimizat, este mai ieftin comparativ cu cele prezente pe piață. De exemplu, compania DANISCO (Danemarca) - cel mai mare

producător mondial de culturi inițiale pentru toate tipurile de produse lactate fermentate și brânzeturi, propune cultura starter Danisco® CHOOZIT series MA 4001/4002 LYO destinată fabricării brânzeturilor și compusă din tulpinile *L. lactis*, *L. cremoris*, *L. diacetylactis*, *S. thermophilus* la un preț de 20,4 lei pentru 2 g de cultură.

Calculul efectului economic, rezultat din implementarea în circuitul economic a propunerii de fabricare a culturilor starter autohtone, în comparație cu culturile starter provenite din import.

Calculul efectului economic anual obținut datorită utilizării propunerilor de raționalizare se efectuează conform formulei 4.4 [18]:

$$E = \sum_{i=1}^k \Delta C_i \times S_i^n = \sum_{i=1}^k (C_i^b - C_i^n) \times S_i^n \quad (4.4)$$

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 – 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.

Efectul economic la 1000 de flacoane fabricate conform prețurilor anului 2018 va constitui:

$$E = (20,4 - 3,74) \cdot 1000 = 16\,660 \text{ lei}$$

Rezultate obținute confirmă fezabilitatea economică a utilizării și implementării culturii starter autohtone (concentrat bacterian), care s-a dovedit a fi mai avantajoasă față de cultura starter importată. Rezultatul dat este comparabil cu cel obținut în cazul concentratului bacterian autohton pentru fabricarea iaurtului, prețul căruia constituie 3,25 lei pentru un flacon (2g) față 19,8 lei pentru cultura starter de import [9].

În continuare a fost evaluată fezabilitatea economică a fabricării brânzei din lapte de capră cu utilizarea culturii starter autohtone, ținând cont de prețul concentratului bacterian obținut. Calculul estimativ al costurilor se realizează pe baza articolelor de calcul utilizate pentru concentratul bacterian.

Calcularea consumului, costului materiei prime și a materialelor de bază pentru fabricarea brânzei din lapte de capră este prezentată în Tabelul 4.13.

Tabelul 4.13. Calcul consumului materiei prime și materialelor de bază pentru 100 kg de brânză din lapte de capră

Materie primă și materiale	Consum, kg	Costul, lei
Lapte de capră	700	2240,0
Cultura starter autohtonă (concentrat bacterian)	0,035	65,45
Praf de cheag	0,018	98,1
Clorură de calciu	0,175	35,0
Sare de uz alimentar	0,4	2,0
Apa potabilă	20,0	180,0
Total		2620,55

Cheltuielile de transport reprezintă 393,08 lei.

Calcul consumului materialelor auxiliare este prezentat în Tabelul 4.14.

Tabelul 4.14. Consumul materialelor auxiliare

Materiale auxiliare	Consum, buc	Prețul, lei	Costul, lei
Material polimeric ambalaj	100	5,0	500,0
Lăzi plastic	10	100,0	1000,0
Total			1500,0

Combustibilul și consumul de energie în scopuri tehnologice ajunge până la 393,08 lei.

Mărimea salariului de bază și suplimentar al lucrătorilor pe unitatea de producție constituie până la 209,64 lei. Contribuțiile sociale constituie 79,7 lei.

Cheltuielile pentru întreținerea și funcționarea echipamentului constituie 83,85 lei.

Cheltuielile legate de secția de producere reprezintă 94,3 lei.

Cheltuielile de producere generale constituie 366,8 lei.

Costul unitar de producție constituie 5348,52 lei.

Cheltuielile nonproducție constituie până la 5,34 lei.

Costul total (sinecostul) constituie 5353,86 lei.

Nivelul mediu de rentabilitate al întreprinderilor din industria alimentară se calculează după formula 4.2, care constituie 1338,46 lei

Prețul en-gros se determină după formula 4.3 și este de 6692,32 de lei.

Astfel, costul a 1 kg de brânză din lapte de capră cu utilizarea culturii starter autohtonă constituie 133,8 lei.

Prețul brânzei obținute din lapte de capră cu aplicarea culturii starter elaborată, este mai ieftin comparativ cu cele prezente în rețele de comercializare. De exemplu, prețul de vânzare al

brânzei din lapte de capră cu adăugarea cheagului este 180 lei pentru 1 kg (SRL Prisvio „Vilador” r-nul Sângerei).

Calculul efectului economic anual rezultat din implementarea în circuitul economic a propunerii de fabricare a brânzei în comparație cu cele propuse de piața. **Conform** formulei 4.4 **efectul economic la 100 kg de brânză** fabricată din lapte de capră va constitui 1620 lei.

4.6 Concluzii la capitolul 4

1. Tulpinile selectate de bacterii lactice sunt compatibile la asociere, iar includerea lor în asociație simbiote permite obținerea unei culturi starter multiple echilibrate, destinate fabricării brânzei în saramură din lapte de capră. Cultura starter elaborată conține 10^9 UFC/ml de lapte degresat, formează coagul omogen și dens, cu proprietăți organoleptice îmbunătățite, specifice brânzeturilor din lapte de capră [6, 7, 51].
2. Utilizarea culturii starter are efect pozitiv asupra mostrelor de brânzeturi fabricate în condiții industriale, îmbunătățind proprietățile biotehnologice și termenul de păstrare a brânzeturilor. Proprietățile antagoniste sporite ale tulpinilor selectate față de agenți patogeni contribuie la ameliorarea indicilor de calitate și siguranță brânzeturilor obținute, comparativ cu probele de lapte fermentat de cultura comercială [7, 50].
3. Utilizarea laptelui de capră pasteurizat pentru fabricarea produselor lactate contribuie la diversificarea tehnologiilor de procesare a materiei prime de calitate sigură și obținerea produselor lactate autohtone cu proprietăți curativ-dietetice și valoare nutritivă înaltă [42].
4. Rezultatele cercetărilor sunt parte componentă a tehnologiei 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 Firmei „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 corespunzătoare. Tehnologia a fost aprobată în condiții industriale la mini-întreprinderea “Major-Auto” SRL (or. Taraclia).
5. Brânza fabricată conform tehnologiei elaborate cu utilizarea culturii starter autohtone își păstrează indicii de calitate la nivel inițial timp de 90 zile, fără a compromite siguranța consumului produsului finit [7].
6. Implementarea tehnologiei de fabricare a brânzei cu aplicarea culturii starter autohtone, elaborată în cadrul lucrării date, asigură un cost de 5 ori mai mic al unui flacon (2g) de cultură starter autohtonă, în comparație cu cele provenite din import, și reduce de 1,3 ori costul brânzei fabricate.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Rezultatele obținute în corelație cu ipotezele emise, scopul și obiectivele formulate în cadrul tezei de doctor „**Valorificarea tulpinilor microbiene izolate din lapte de capră pentru aplicare industrială**”, au condus la formularea următoarelor concluzii generale:

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 [44, 45, 47, 101, 125], [cap.3, p.3.2-3.5, p.3.7].
2. Tulpinile selectate manifestă activitate antagonistă față de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*, contribuind la prevenirea dezvoltării infecțiilor intestinale și a patogenilor atât în probele de lapte, cât și în produse lactate din lapte de capră [6, 51], [cap.3, p.3.4, p.3.7].
3. Mediul protector, elaborat în baza metodei matematice de planificare a experiențelor, conține un raport optimal de laptele 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 [49], [cap.3, p.3.7].
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, p.4.3].
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 nesfărâmcioasă moale, gust și miros ameliorat, termen de valabilitate îndelungat și conținut înalt de bacterii lactice viabile - 10^8 UFC/g pe durata păstrării [7, 50], [cap.4, p.4.1, p.4.3-4.4].

Aportul personal. În materialele care reflectă conținutul brevetului de invenție MD 1299 Y din 2019.01.31 „Procedeu de obținere a brânzei din lapte de capră” (Anexa 10) autorului îi revine cota parte în corespundere cu lista autorilor. Toate celelalte rezultate obținute în cadrul tezei de doctor, analiza, generalizările și concluziile aparțin autorului.

Rezultatele științifice principale care au contribuit la soluționarea problemei științifice importante, pusă în fața acestei lucrări: (*selectarea unor tulpini noi de bacterii lactice mezofile și termofile de importanță tehnologică în scopul utilizării lor în componența culturii starter autohtone pentru fabricarea produselor lactate fermentate din lapte de capră*) sunt următoarele:

1. Bacteriile lactice (în număr de 7) izolate în cultură pură din 150 probe de lapte crud de capră prelevat din 12 regiuni ale Republicii Moldova, conform descrierii sunt caracteristice speciilor *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Streptococcus thermophilus*.

2. Tulpinile selectate și descrise sunt adaptate la calitatea materiei prime și posedă caracteristici biotehnologice valoroase și stabile. Se caracterizează prin activitate fermentativă sporită, conțin 10^9 UFC în 1 ml de lapte fermentat și produc acid lactic în cantități suficiente pentru prevenirea dezvoltării microoragismelor patogene.

3. Cultura starter autohtonă BriCheese, elaborată pe baza tulpinilor 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.

În aspect teoretic, rezultatele lucrării au contribuit la acumularea datelor noi referitoare la biodiversitatea tulpinilor autohtone izolate din lapte crud de capră din diferite zone ale R. Moldova; a fost argumentată științific perspectiva utilizării culturii starter autohtonă de bacterii lactice pentru prepararea brânzei din lapte de capră. Au fost propuse un mediu nutritiv 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 129 9 Y din 2019.01.31 „Procedeu de obținere a brânzei din lapte de capră” (Anexa 10).

În aspect aplicativ, a fost elaborată cultura starter autohtonă 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 Nepatogene,

precum și elaborarea documentului tehnico-normativ Standardul Moldovenesc „Brânză din lapte de capră și de oaie. Specificații”.

Rezultatele științifice obținute în lucrare au fost aprobate la următoarele foruri științifice naționale și internaționale: The III-d International Conference of Modern Technologies in the Food Industry (Chișinău, R. Moldova, 2016); The 3rd International Conference On Microbial Biotechnology (Chișinău, R. Moldova, 2016); Conferința științifică internațională a doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, edițiile a V-a și a VI-a (Chișinău, R. Moldova, 2016, 2017); Conferința națională cu participare internațională „Știința în Nordul Republicii Moldova: Realizări, probleme, perspective”, (Bălți, R. Moldova, 2017); 83 International scientific conference of young scientist and students “Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution”, NUFT (Kiev, Ukraine, 2017); UGAL INVENT Salonul Inovării și cercetării (Galați, România, 2017), The 10th Edition of EUROINVENT European Exhibition of Creativity and Innovation (Iași, România, 2018), The 20nd Edition of International Exhibition of Inventics “INVENTICA” (Iași, România, 2018).

Rezultatele științifice obținute în lucrare sunt publicate în 5 articole: 1- revistă internațională cotate ISI și SCOPUS, 2- reviste recunoscute în străinătate, 2 - revistă din Registrul Național al revistelor de profil, categoria B, C; din care 4- în monoautorat; 3 articole în culegeri, 8 rezumate ale comunicărilor științifice; 1 brevet de invenție de scurtă durată.

Rezultatele științifice obținute în teză 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; SRL „Major-Auto” (Anexa 6), or. Taraclia, R. Moldova la fabricarea loturilor experimentale de brânzeturi (Anexele 3, 8 și 9) și utilizate în elaborarea Standardului Moldovenesc „Brânză din lapte de capră și de oaie. Specificații” (Anexa 7).

RECOMANDĂRI PRACTICE

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 din 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.

BIBLIOGRAFIE

În limba română

1. *Anuarul Statistic al Republicii Moldova*. Chișinău: BIROUL NAȚIONAL DE STATISTICĂ AL REPUBLICII MOLDOVA, 2016. 410 p. ISBN 978-9975-53-766-7.
2. BANU, C. și alte. *Valorificarea laptelui de capră. Ghid practic pentru fermieri*. București: Editura Agir, 2007. pp.24-41.
3. BĂISAN, I. *Operații și tehnologii în industria alimentară: curs pentru studenții specializării mașini și instalații pentru agricultură și industria alimentară*. Universitatea Tehnică „Gh. Asachi” Iași, 2015. 365 p.
4. BĂRZOI, D. *Microbiologia produselor alimentare de origine animală*. București: Editura Cereș, 1985. 241 p.
5. **BOGDAN, Nina**, CARTASEV, Anatoli. Crearea asociațiilor de bacterii lactice pentru culturile starter. În: *Materialele Conferinței Științifice cu participare internațională a doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, ediția a V-a, 15 martie 2016*. Chisinau: Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, 2016, p. 136. ISBN 978-9975-3054-5-7.
6. **BOGDAN, Nina**. Cultura mixtă din tulpini autohtone de bacterii lactice pentru fermentarea laptelui de capră. În: *Revista Pomicultura, Viticultura&Vinificatia*. 2018, vol. 1-2 (73-74), pp. 68-71. ISSN 1857-3142.
7. **BOGDAN, Nina**, NECRÎLOVA, Liudmila, CARTAȘEV, Anatoli, COEV, Ghenadie, RUDIC, Valeriu. *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. Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare. Nr. depozit s 2018 0017. Data depozit 15.03.18. Publicat 31.01.2019. In: BOPI. 1/2019.
8. **BOGDAN, Nina**, RUDIC, Valeriu, COEV, Ghenadie. Actualitatea studiului laptelui de capră ca sursă de izolare a tulpinilor de bacterii lactice. În: *Buletin Academie de Științe, Științe Vieții*. 2016, № 3 (330), pp. 150-156. ISSN 1857-064X.
9. CARTAȘEV, A. *Tulpini autohtone noi de Streptococcus thermophilus și utilizarea lor pentru fabricarea produselor lactate fermentate: tz. de doct. în biologie*. Chișinău, 2018. 180 p.
10. CHIRLICI, A., JALBA, U. *Igiena alimentației: compendiu de lucrări practice*. Chișinău: Medicina, 2000. 528 p. ISBN 9975-945-44-9.
11. COEV, G. et al. Colecția Ramurală de tulpini de bacterii lactice cu proprietăți tehnologice valoroase pentru industria laptelui. În: *Buletin Științific, Științele naturii*. 2009, vol. 10(23),

pp. 190-197. ISSN 1857-0054.

12. COSTIN, G. *Produse lactate fermentate*. România: Editura Academica, Galați, 2005. 586 p. ISBN 9738316855.

13. GOST 10444.12-88. Produse alimentare. Metoda de determinare a drojdiilor și mușegaiurilor. Chișinău: Departamentul "Moldova-Standard", 1992, 6 p.

14. GOST 3624-92. Lapte și produse lactate. Metode titrimetrice pentru determinarea aciditate. Chișinău: Departamentul "Moldova-Standard", 1992, 10 p.

15. 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”. Chișinău: Departamentul Moldova-Standard", 1992, 8 p.

16. GUZUN, V. et al. *Industrializarea laptelui*. Chișinău: Tehnica-info, 2001. 488 p. ISBN 9975-63-064-2.

17. 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.

18. 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.

19. LAUDONIU, A. *Obținerea și utilizarea culturilor pentru fabricarea diferitelor assortimente de brânzeturi*. București: Institutul de Chimie Alimentară, 1995. 20 p.

20. NECRÎLOVA, Liudmila, **BOGDAN, Nina**, BUREȚ, Elena, COEV, Ghenadie. *Procedeu de obținere a brânzei și băuturi din zer acru (variante)*. Brevet de invenție MD 889 Y, A23C 21/00, A23C 21/08, A23C 19/00, A23L 2/02, A23C 9/12, A23C 9/127, A23C 9/133, C12R 1/46. Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare. Data depozit 03.06.14. Publicat 31.03.2015. În: BOPI nr. 3/2015.

21. Ordinul Ministerului Agriculturii și Industriei Alimentare al Republicii Moldova №36 din 3 martie 2014 cu privire la aprobarea Nomenclatorului raselor, tipurilor și crossurilor de animale omologate (raionate) în Republica Moldova. În: *Monitorul Oficial al Republicii Moldova*, 2014, nr.80-85, art. 425.

22. Ordinul Ministerului Agriculturii și Industriei Alimentare nr.173 din 14 iulie 2006 cu privire la aprobarea Normei sanitar-veterinare privind condițiile de sănătate pentru producerea și introducerea pe piață a laptelui crud și a laptelui tratat termic și a produselor pe bază de lapte. În: *Monitorul Oficial al Republicii Moldova*, 2007, nr.54-56, art. 216.

23. RAMONA, I. *Tehnologii neconvecționale, conforme cu reglementările Europene, de îmbunătățire a calității nutritive și igienice a laptelui de capră*: tz. de doct. în biotehnologii agricole. Cluj – Napoca, 2011. 224 p.
24. SM SR EN ISO 5943 Brânză și produse din brânză procesată. Determinarea conținutului de cloruri. Metoda prin titrare potențiometrică. Chișinău: Institutul Național de Standardizare, 2012, 16 p.
25. SM EN ISO 1735:2014 Brânză și produse de brânză procesată. Determinarea conținutului de grăsime. Metoda gravimetrică (Metoda de referință). Chișinău: Institutul Național de Standardizare, 2014, 26 p.
26. SM 317: 2015 Lapte crud de capră și oaie. Specificații. Chișinău: Institutul Național de Standardizare, 2015, 12 p.
27. SM ISO 4831:2010 Microbiologia alimentelor și furajelor. Metoda orizontală pentru detectarea și enumerarea bacteriilor coliforme. Tehnica numărului cel mai probabil. Chișinău: Institutul Național de Standardizare, 2010, 20 p.
28. SM ISO 4832:2016 Microbiologia produselor alimentare și furajelor. Metoda orizontală pentru numărarea bacteriilor coliforme. Metoda de numărare a coloniilor. Chișinău: Institutul Național de Standardizare, 2016, 11 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 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.
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. SM SR EN ISO 5534:2014 Brânzeturi și brânzeturi procesate. Determinarea conținutului total de substanță uscată (Metoda de referință). Chișinău: Institutul Național de Standardizare, 2017, 21 p.
33. 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.

34. TAFTĂ, V. *Creșterea ovinelor și caprinelor*. București: Editura Ceres, 2008. 397 p. ISBN 9789734008612.

35. ȚIFREA, A. *Cercetări privind îmbunătățirea calității și a însușirilor nutritive produselor lactate cu adaos de produse naturale bioactive*: tz. de doct. în tehnică. Sibiu, 2012. 160 p.

În limba engleză

36. ABD-ELHAMED, A. et al. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Egyptian Laban Rayeb and the use of some isolated cultures in the preparation of Laban Rayeb. In: *Dairy Science*. 2009, vol. 37, (2), 99 p. ISSN 0022-0302.

37. ADOLFSSON, O., MEYDANI, S., RUSSELL, R. Yogurt and gut function. In: *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, vol. 80 (2), pp.45–56. ISSN (Print) 0002-9165.

38. BADIS, A. et al. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolate from raw goat milk of four Algerian races. In: *Journal Food Microbiology*. 2004, vol. 21(5), pp.579-588. ISSN 0740-0020.

39. BEUKES, E., BESTER, B., MOSTERT, J. The microbiology of South African traditional fermented milks. In: *International Journal Food Microbiology*. 2001, vol .63, pp. 189-197. ISSN 0168-1605.

40. BISSONNETTE, F. et al. Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged cheddar cheese. In: *International Dairy Science*. 2000, vol. 83, pp. 620-627. ISSN (Online) 1811-9751 .

41. BLAZENKA, K. et al. Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008, vol. 24(5), pp. 699-707. ISSN (Online) 1573-0972.

42. **BOGDAN, Nina**. 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 I, NUFT, 5-6 april 2017*. Ukraine, Kiev, p. 339.

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

44. **BOGDAN, Nina**. 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, 15 martie 2016. Chisinau: Universitatea Academiei de Ştiinţe a Moldovei, 2016, p. 136. ISBN 978-9975-3054-5-7.
45. **BOGDAN, Nina.** 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.
46. **BOGDAN, Nina.** Composition and characteristics of goat milk: a review. In: *Proceedings of International Conference „Modern technologies in the food industry-2016”*, october 20-22, 2016, Chişinău, Republic of Moldova, p. 135. ISBN 978-9975-87-138-9.
47. **BOGDAN, Nina.** 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, 5-6 april 2017*. Ukraine, Kiev, p. 341.
48. **BOGDAN, Nina.** Goat milk – actual direction in dairy industry. In: *Materialele Conferinţei Ştiinţifice cu participare internaționala a doctoranzilor „Tendinte contemporane ale dezvoltarii stiintei: viziuni ale tinerilor cercetatori”, editia a VI-a, 15 iunie 2017*. Chisinau: Universitatea Academiei de Ştiinţe a Moldovei, 2016, pp. 171-176. ISBN 978-9975-108-16-4.
49. **BOGDAN, Nina.** 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, Chişinău, Republic of Moldova. ISBN 978-9975-3178-8-7.
50. **BOGDAN, Nina.** 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*. Iaşi: StudIS, 2018, p. 234. ISSN 2601-4564.
51. **BOGDAN, Nina.** 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, Galaţi, România. ISSN 978-606-696-091-5.
52. **BOGDAN, Nina.** The potential of goat milk for new products. In: *Materialele Conferinţei Ştiinţifice națională cu participare internaționala „Ştiinţa şi inovarea în nordul Republicii Moldova: probleme, realizari, perspective”*, septembrie 25-26, 2015, p. 45, Balti, Republica Moldova, ISBN 978-9975-3054-5-7.

53. 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, pp. 21-35. ISSN 0001-8686.
54. CAGNO, R. Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lacto bacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. In: *International Dairy Journal*. 2006, vol.16, pp. 119-130. ISSN 0958-6946.
55. 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: *Journal Elsevier, Food Microbiology*. 2016, vol.53, pp. 94–103. ISSN 0740-0020.
56. CARTASEV, A., BURET, E. Conservation method of strains of lactic acid bacteria. În: *International Conference of young researches, ediția 9*, octombrie 11, 2011, Chișinău, Republica Moldova, p. 13. ISBN 978-9975-4224-7-5.
57. CHARALAMPOPOULOS, D., ROBERT, A. Prebiotics and probiotics. In: *Science and Technology, Springer Science and Bussiness*. 2009. ISBN: 9780387790572. Disponibil: <https://link.springer.com/content/pdf/bfm%3A978-0-387-79058-9%2F1.pdf> (citat 11.06.2018).
58. CHERIGUENE, A., CHOUGRANI, F., BENSOLATE, A. Identification and technological potential of lactic acid bacteria of Algeria goat's milk microflora. In: *African Crop Science Conference Proceedings*. 2007, vol. 8. pp. 1165-1169. ISSN 1023-070X.
59. 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.
60. CHULUUNBAT, Tsend-Ayusha, YOH-CHANG, Yoon. Developing fermented goat milk containing probiotic bacteria. In: *Journal Foods and Raw Materials*. 2013, vol.1(2), pp.30-32. ISSN (Online) 2310-9599.
61. DANISCO Cultures. *Cultures for feta. MA acidifying*. Danisco Group, 2018. Disponibil: <https://www.orchard-dairy.co.uk/product-category/cheese-starter-cultures/cultures-for-feta-type-cheeses/feta/> (citat 1.05.2018).
62. DE REU K. et al. Hygienic parameters, toxins and pathogen occurrence in raw milk cheeses. In: *Journal of Food Safety*. 2007, vol. 22, (3), pp.183–196. ISSN (Online) 1745-4565.
63. 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.

64. FITZSIMONS, N. et al. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. In: *Applied Environ. Microbiology*. 1999, vol.65, pp. 3418-3426. ISSN (Online) 1098-5336.
65. GANDHI, D. Microbiology of fermented dairy products. *Dairy Microbiology Division*. National Dairy Research Institute, Karnal. Haryana. India. 2006, pp. 1-31.
66. GUESSAS, B., KIHAIL, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. In: *African Journal of Biotechnology*. 2004, vol. 3 (6), pp. 339-342. ISSN (Online) 1684-5315.
67. GUPTA, A., SHARMA, N. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria- *Lactococcus acidilactici* ch-2 isolated from chuli- a traditional apricot product of himalayan region for the production of novel bioactive compounds with special therapeutic properties. In: *Journal of Food Microbiology, Safety & Hygiene*. 2017, vol.2(1), p.119. ISSN 2476-2059.
68. 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.
69. HOLZAPFEL, W.H., SHULINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. In: *Food Research International Journal*. 2002, vol.35. pp. 109-116. ISSN 0963-9969.
70. HOMAYOUNI, A. et al. Growth and survival of some probiotic strains in simulated ice cream conditions. In: *Journal of Applied Science*. 2008, vol.8 (2), pp. 379-382. ISSN 18125654.
71. HYO-HEE Kim et al. Galactooligosaccharide and sialyllactose content in commercial lactose powders from goat and cow milk. In: *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 2015, vol.35 (4), nr.4, pp. 572-576. ISSN 12258563.
72. HYUN-JUE Kim et al. Characterization of lactic bacterial strains isolated from raw milk. In: *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. 2006, vol. 19 (1), pp. 131-136. ISSN (Online) 1976-5517.
73. ISO 22662:2007 Milk and milk products - Determination of lactose content by high-performance liquid chromatography (Reference method). International Organization for Standardization, 2007, 10 p.
74. ISO 9232-2003 Yogurt — Identification of characteristic microorganisms (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*). Geneva: International Organization for Standardization, 2003, 17 p.

75. JAKOBSEN, R.A. et al. Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in Norwegian raw milk cheese production. In: *Food Microbiology Journal*. 2011, vol. 28(3), pp. 492-496. ISSN 0740-0020.
76. KAILASAPATHY, K., SULTANA, K. Survival and beta-D-galactosidase activity of encapsulated and free Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis in ice-cream. In: *Australian Journal of Dairy Technology*. 2003, (58), p. 223–227. ISSN 0004-9433.
77. KARNA, B. et al. Lactic acid and probiotic bacteria from fermented and probiotic dairy products. In: *Science Diliman*, 2007, vol. 19(2), pp.23-24. ISSN (Online) 2012-0818.
78. KIERONEZYK, A. et al. Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences aminoacid conversion to aroma compounds by Lactococcus lactis. In: *Journal Applied Microbiology*. 2006. vol. 101 (5), 221 p. ISSN (Online) 1365-2672.
79. KONGO, J. et al. Manufacturing of fermented goat milk with a mixed starter culture of Bifidobacterium animalis and Lactobacillus acidophilus in a controlled bioreactor. In: *Journal Applied Microbiology*. 2006, vol. 42(6), p.595-599. ISSN (Online) 1365-2672.
80. KURMANN, J., RASIC, J. The health potential of products containing bifidobacteria. In: *Therapeutic Properties of Fermented Milks* ed. Robinson, R.K. Elsevier Applied Food Sciences. 1991, pp. 117–158. ISBN 978-1851665525.
81. LASIK, A., PIKUL, J. Production of fermented goat beverage using a mixed starter culture of lactic acid bacteria and yeasts. In: *Journal Engineering in Life Sciences*. 2012, vol.12 (4), pp.486-493. ISSN (Online) 1618-2863.
82. LE BARS, D., IVON, M. Formation of diacetyl and acetoin by Lactococcus lactis via aspartate catabolism. In: *Journal Applied Microbiology*. 2008, vol. 104 (1), 304 p. ISSN (Online) 1365-2672.
83. 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.
84. LENCASTRE FERNANDES, R. et al. Experimental methods and modeling techniques for description of cell population heterogeneity. In: *Biotechnology Advances*. 2011, nr. 29, pp. 575-599. ISSN 0734-9750.
85. LEUSCHNER FERNANDES, R. et al. Methods for the official control of probiotics used as food additives. In: *European Comission Community Research*. 2002. vol. 2. Disponibil: https://cordis.europa.eu/project/rcn/46530_en.html (citat 11.06.2018).

86. *Live animals*. Disponibil: <http://www.fao.org/faostat/ru/#data/QA/visualize> (citat 30.05.2018).
87. MARK, E. Mesophilic and thermophilic cultures used in traditional cheesemaking. In: *Microbiology Spectrum*. 2013, vol. 1(1), pp.1-18. DOI: 10.1128/microbiolspec.CM-0004-2012. ISSN (Online) 2165-0497.
88. MARTINOVIĆ, A. et al. Isolation and characterization of bacterial flora from farmhouse fermented milk products of Serbia and Montenegro. In: *Acta Veterinaria*. 2005, vol. 55, pp. 307-318. ISSN 05678315.
89. MAYSOON, S. et al. An ecological study of lactic acid bacteria: isolation of new strains of lactococcus including *Lactococcus lactis subspecies cremoris*. In: *Journal of Dairy Science*. 1995, vol. 78 (5), pp.1004-p.1017. ISSN 0022-0302.
90. MITUNIEWICZ-MALEK A., DMYTRÓW I., ZIARNO M. *Method for production of a fermented goat's milk beverage*. European Patent Application 3138409 A1, A23C 9/127. Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie. Date of filing: 23.09.2015, Date of publication: 08.03.2017. Bulletin 2017/10.
91. NOMURA, M., KOBAYASHI, M., NARITA, T., KIMOTO-NIRA, H., OKAMOTO, T. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. In: *Journal Applied Microbiology*. 2006, vol. 101 (2), pp. 396-405. ISSN (Online) 1365-2672.
92. NOVAK, L., LOUBIERE, P. The metabolic network of *Lactococcus lactis*: distribution of ¹⁴C-labeled substrates between catabolic and anabolic pathways. In: *Journal of Bacteriology*. 2000, vol.182 (4), pp. 1136–1143. ISSN (Online) 1098-5530.
93. OLFAT, S. et al. Identification and probiotic characteristics of lactobacillus strains isolated from traditional domiati cheese. In: *International Journal of Microbiology Research*. 2011, vol. 3 (1), pp. 59-66. ISSN 0975-5276.
94. OSTLIE, H., TREIMO, J., NARVHUS, J. Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. In: *International Dairy Journal*. 2003, vol.15, pp. 989–997. ISSN 0958-6946.
95. PAPADEMAS, P., BINTSIS, T. Microbiological quality of white-brined cheeses: A review. In: *International Journal of Dairy Technology*. 2002, vol. 55(3), pp. 113 – 120. ISSN (Online) 1364-727X.
96. POPOVICI, C. et al. InoBioProd: innovation challenges and scientific perspectives. In: *Ukrainian Food Journal*. 2017, vol. 6(2), pp. 379. ISSN (Online) 2313–5891.

97. PRASANNA, P., GRANDISON, A., 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, pp. 15–22. ISSN 0963-9969.
98. RADULOVIĆ, Z. et al. Lactic acid bacteria in white brined cheese production. In: *Mljekarstvo Dairy*. 2011, vol. 61 (1), pp.15-25. ISSN 0026-704X.
99. ROHIT, S. et al. Characterization of lactic acid bacteria from raw milk samples of cow, goat, sheep, camel and buffalo with special elucidation to lactic acid production. In: *British Microbiology Research Journal*. 2013, vol. 3(4), pp. 743-752. ISSN 2231-0886.
100. ROSS, R., MORGAN, S, HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. In: *International Journal Food Microbiology*. 2002, vol. 79(1-2), pp.3-16. ISSN 0168-1605.
101. RUDIC, Valeriu, **BOGDAN, Nina**. 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.
102. RUSU, E. et al. Assessment of antimicrobial effect of certain lactic acid bacteria species. In: *Revista română de boli infecțioase*. 2015, vol.18, pp.20-23.
103. SAVESKI, A. Technological properties of white brined cheese produced from organic certified goat milk. In: *Journal of Faculty of Food Engineering, Ștefan cel Mare University of Suceava*. 2015, vol. 15 (3), pp. 250 – 255. ISSN 2068-6609.
104. SAXELIN, M., KORPELA, R., MAYRA-MAKINEN, A., Introduction: classifying functional dairy products. In: *T. Mattila-Sandholm, M. Saarela (Eds.), Functional Dairy Products, Woodhead Publishing Limited, Cambridge*. 2003, pp. 1–16. ISBN (Online) 9781855736917.
105. SENGÜL, M. Microbiological characterization of Civil cheese, a traditional Turkish cheese: microbiological quality, isolation and identification of its indigenous lactobacilli. In: *Word Journal Microbiology And Biotechnology*. 2006, vol. 22 (6), pp 613-618. ISSN (Online) 1573-0972.
106. SERVİN, A. Antagonistic activities of Lactobacilli and Bifidobacteria against microbial pathogens. In: *FEMS Microbiology Reviews*. 2004, vol. 28 (4), pp. 405–440. ISSN (Online) 1574-6976.

107. SHAH, N. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. In: *Journal of Dairy Science*. 2000, vol.83, pp. 894-907. ISSN 0022-0302.
108. SHUANGQUAN, B. et al. Microflora in traditional starter cultures for fermented milk, hurunge, from inner Mongolia. In: *Animal Science Journal*. 2006, vol. 77(2), 130 p. ISSN (Online) 1740-0929.
109. SIRIWAN, N. et al. Isolation and selection of probiotic lactic acid bacteria from cassava pulp for cholesterol lowering property. In: *13th ASEAN Food Conference „Meeting Future food Demands. Security & Sustainability”*, September 9-11, 2013, Singapore.
110. TABOADA, N. et al. Characterization and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditional argentinean goat's milk products. In: *Journal Food Biotechnology*. 2014, vol. 28 (2), pp.123-141. ISSN 0890-5436.
111. TSAKALIDOU, E. et al. Identification of streptococci from Greek Kasser cheese and description of *Streptococcus macedonius* sp. nov. In: *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1998, vol. 48 (1), pp. 519-527. ISSN (Online) 1466-5034.
112. 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.
113. WIDODO, H. et al. Fermented goat milk and cow milk produced by different starters of lactic acid bacteria: quality studies. In: *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2013, vol. A(3), pp. 904-911. ISSN 23453737.
114. W.L.G. de Almeida Junior et al. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. In: *Elsevier Journal, Food Control*. 2015, vol. 53, pp.96-103. ISSN 0956-7135.
115. YOUNG-JUNG, Wee, JIN-NAM, Kim, HWA-WON, Ryu. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. In: *Journal of Food Technology and Biotechnology*. 2006, vol. 44(2), pp.163-172. ISSN 1330-9862.
116. ZAMFIR, M., GROSU-TUDOR, S. Probiotic potential of some lactic acid bacteria isolated from Romanian fermented vegetables. In: *Annals of RSCB 2012*. 2012, vol.18(1), p.234-239.
117. ZEKI, B. *Food Process Engineering and Technology*. 2nd Edition. Academic Press, 2013. 720 p. ISBN 978-0-12-373660-4.

118. АНАНЬЕВА, Н. и др. Применение иммобилизованных форм пробиотических бактерий в производстве молочных продуктов. В: *Молочная промышленность*. 2006, №11, с. 46-47. ISSN 1019-8946.
119. БАННИКОВА, Л. *Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности*. Москва: Пищевая промышленность, 1975. 256 с.
120. БЕЛКОВА, М. Производство творога: выбор заквасочных культур. В: *Молочная промышленность*. № 2, 2016, с. 34-35. ISSN 1019-8946.
121. БЕЛОВ, А. Некоторые аспекты управления созреванием сыров. В: *Продукты питания и рациональное использование сырьевых ресурсов: сб. науч. работ. Вып. 2*. Кемерово, 2001, с. 28-32.
122. БЕЛОВ, А. Протеолитическая активность молочнокислых бактерий, используемых в сыроделии. В: *Научное обеспечение сыродельной отрасли: сб. науч. тр. Барнаул*, 2004, с. 44-46.
123. БЕСЕДИН, А. Мировой рынок молока и молочных продуктов. В: *Переработка молока*. 2013, № 9, с. 58-62. ISSN (Print) 2222-5455.
124. БИРГЕР, М. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования*. Москва: Медицина, 1982. 461 с.
125. **БОГДАН, Нина**, КОЕВ, Геннадий. Биоразнообразие 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.
126. ВИННИКОВА, О. и др. *Выделение и идентификация бактерий: методические рекомендации*. Харьков : ХНУ имени В. Н. Каразина, 2011, с.60.
127. ВОБЛИКОВА, Т., СЫЧОВ, О., ПЕРМЯКОВ, А. Разработка технологии мягких сыров с пробиотическими свойствами на основе козьего молока. В: *Овцы, козы, шерстяное дело*. 2010, № 3, с. 30–33.
128. ГАВРИЛОВА, Н. Биотехнологические аспекты производства творожного продукта на основе козьего молока. В: *Вестник Омского ГАУ*. 2017, №3 (25), с.143-149. ISSN 2222-0364.
129. ГАНИНА, В. Микробиологический контроль сырого молока. В: *Молочная промышленность*. 2010, № 2, с. 12-13. ISSN 1019-8946.

130. ГАРЕТОВА, Л., КИРИЕНКО, О. *Оценка параметров роста микроорганизмов в условиях периодического и непрерывного культивирования: методические указания*. [online]. Хабаровск: Изд. Тихоокеан. гос. ун-та, 2010, 16 с. (citat 15.03.2018). Disponibil: <http://docplayer.ru/26542316-Ocenka-parametrov-rosta-mikroorganizmov-v-usloviyah-periodicheskogo--nepreryvnogo-kultivirovaniya.html>.
131. ГУБИНА, И. Закваски прямого внесения “Иджея” для производства молочной продукции. В: *Молочная промышленность*. № 2, 2016, с. 49. ISSN 1019-8946.
132. ДИЛАНЯН, З. Факторы, определяющие вид и качество сыра. В: *Повышение эффективности производства и качества молочных продуктов*: Тез. докл. науч.-тех. конф. Каунас, 1982, ч.1, с. 77-78.
133. ДОСПЕХОВ, Б. *Методика полевого опыта*. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.
134. ЕГОРОВ, Н. *Основы учения об антибиотиках*. Москва: Наука, 2004, 528 с. ISBN 5-02-033595-9.
135. ЕЛИЗАРОВА, В., ТОЛСТЫХ, О. Закваски для творога. В: *Молочная промышленность*. Москва, ВНИМИ, 2002, № 7, 87 с. ISSN 1019-8946.
136. ЕМЦЕВ, В. *Микробиология: учебник для бакалавров*. Москва: Юрайт, 2012, 445 с. ISBN 978-5-9916-3019-1.
137. ЕФИМОЧКИНА, Н. Обнаружение энтеротоксигенных стафилококков в сыром молоке и молочной продукции. В: *Молочная промышленность*. 2018, №1, с. 53. ISSN 1019-8946.
138. ЕФРЕМЕНКО, Е., ТАТАРИНОВА, Н. Влияние длительного хранения клеток микроорганизмов, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта, на их выживаемость и биосинтез целевых метаболитов. В: *Микробиология*. 2007, т. 76, №3, с. 383-389. ISSN(Print) 0026-3656.
139. ЗОБКОВА, З. и др. Биотехнологические и микробиологические аспекты производства творога с увеличенным сроком годности. В: *Молочная промышленность*. №1 2016, с.49-50. ISSN 1019-8946.
140. ЗОБКОВА, З. и др. О твороге как национальном продукте. В: *Молочная промышленность*. 2016, №11, с. 28-30. ISSN 1019-8946.
141. *Как сделать правильный творог*. Москва: Молочная промышленность, 2017, № 7, с.44-45. ISSN 1019-8946.
142. КАЛИНИНА, Л. и др. *Технология цельномолочных продуктов. Учебное пособие*. СПб.: ГИОРД, 2008, 248 с.

143. КАППЕНКО, Н., ГОСТИЩЕВА, Н., ЗУБКОВА, И. Приготовление производственных заквасок гарантированного качества для выработки ферментированных молочных продуктов. В: *Вестник СевКавГТУ Сер. Продовольствие*. 2003, № 1, 188 с. ISBN 5-9296-0148-8.
144. КИГЕЛЬ, Н. Заквасочные культуры для ферментированных молочных продуктов: основные виды. В: *Молочная промышленность*. 2005, с. 26–29. ISSN 1019-8946.
145. КИСЛЕНКО, В. *Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии*. Москва: Колос, 2005, 232 с.
146. КИТАЕВСКАЯ, С. Современные тенденции отбора и идентификации пробиотических штаммов молочнокислых бактерий. В: *Вестник Казанского технологического университета*. 2012, №17, с. 184-188. ISSN (Print) 1998-7072.
147. КОВАЛЕНКО, Н., ЛЯСКОВСКИЙ, Т., ПОДГОРСКИЙ, В. Экология молочнокислых бактерий, их таксономия и практическое использование. В: *XIII съезд Товарищества микробиологов Украины им. Виноградского. Тези доповідей* 25-30 травня, 2009. с. 14
148. КОРНАБАЕВА, З. Изучение молочнокислых микроорганизмов, выделенных из кисломолочных продуктов Казахстана. В: *Журнал научных публикаций аспирантов и докторантов*. 2014, с.5. ISSN (Print) 1991-3087.
149. КОРНЕЛАЕВА, Р., СТЕПАНЕНКО, П., ПАВЛОВА, Е. *Санитарная микробиология сырья и продуктов животного происхождения*. Учебник. М.: ООО «Полиграфсервис», 2006, 407 с.
150. КРАСНИКОВА, Л. ГУНЬКОВА, П. *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.
151. КРИГЕР, А., БЕЛОВ, А. Влияние ферментных композиций на протеолиз в сырах. В: *Сыроделие и маслоделие*. 2010, № 3, с. 38-40. ISSN (Print) 2073-4018.
152. КУЛЕШОВА, С. Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар. В: *Журнал Ведомости, Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Ежеквартальный рецензируемый научно-практический*, №3, 2015, с.13-17. ISSN (Online) 2619-1172 .
153. КУПЛЕТСКАЯ, М., НЕТРУСОВ, А. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения. В: *Микробиология*. 2011, т. 80, № 6, с. 8. ISSN (Print) 0026-3656.

154. ЛАРИЧЕВ, О. Влияние ферментов на качество сыров. В: *Сыроделие и маслоделие*. 2003, № 3, с. 17-19. ISSN (Print) 2073-4018.
155. ЛЕПИЛКИНА, О., ШЕРГИНА, И. Процесс молочнокислого брожения и реологические свойства сыра. В: *Сыроделие и маслоделие*. 2002, № 6, с. 36-38. ISSN (Print) 2073-4018.
156. 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.
157. МИРОНЕНКО, И. Удивительный мир воды в молоке. Роль воды в процессе преобразования молока в сыр. В: *Сыроделие и маслоделие*. 2010, № 1, с. 6-9. ISSN (Print) 2073-4018.
158. НОВИК, Г.и др. Биологическая активность микроорганизмов пробионтов. В: *Прикладная биохимия и микробиология*. 2006, т.42, №2, с.187-194. ISSN (Print) 0555-1099.
159. Определитель бактерий Берджи. Под редакцией Дж. Харета, Н. Харега. 9-е издание, т.2, Москва, «Мир», 1997, 1138 с.
160. ПЕРФИЛЬЕВ, Г. и др. *Бактериальные закваски, препараты и концентраты*. Углич: Экспериментальная биофабрика Россельхозакадемии, 1995, 110 с.
161. ПРОСЕКОВ, А., ОСТРОУМОВ, Л. Инновационный менеджмент биотехнологий заквасочных культур. В: *Техника и технология пищевых производств*. 2016, т. 43, пг.4, с.64-67. ISSN (Online) 2313-1748.
162. Р 50.1.037-2002 Прикладная статистика. Правила проверки согласия опытного распределения с теоретическим. Часть II. Госстан. Р: Москва, 60 с.
163. РАМАНАУСКАС, Р. Вопросы повышения качества сычужных сыров. В: *Переработка молока*. 2004, № 4, с. 6-8. ISSN (Print) 2222-5455.
164. РОГОЖИНА, Т. и др. Пробиотические культуры и биологически активные белки молока. Новый функциональный комплексный компонент. В: *Молочная промышленность*. 2012, № 5, с.30-31. ISSN 1019-8946.
165. РОЖКОВА, Т. Российский рынок заквасочных культур. В: *Молочная промышленность*. 2006, № 3, с.23-24. ISSN 1019-8946.
166. РУССКИХ, В. Традиционная технология производства творога в современном аппаратном оформлении. В: *Молочная промышленность*. 2018, №1, с. 18-20. ISSN 1019-8946.

167. 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>
168. РЫЖКОВА, Т. Результаты исследований состава козьего молока и его микробиологических показателей,использованных при разработке Гост Украины. В: *SWORLD*.2013.(citat15.03.2018). Disponibil: <https://www.sworld.com.ua/index.php/ru/c113-5/16376-c113-222>.
169. *Сборник инструкций по селекции молочнокислых бактерий и бифидобактерий и подбору заквасок для кисломолочных продуктов*. Москва: ВНИИМС, 1986, 100 с.
170. СЕМЕНИХИНА, В. и др. Влияние микрофлоры на качество творога. В: *Молочная промышленность*. № 3, 2016, с. 51-52. ISSN 1019-8946.
171. СОЛОВЬЕВА, Е. Новые заквасочные культуры для кисломолочных продуктов и сыров. В: *Молочная промышленность*. 2005, №9, с. 14 – 15. ISSN 1019-8946.
172. СТЕПАНЕНКО, П. *Микробиология молока и молочных продуктов*. М.,1999.412 стр.
173. СТОЯНОВА, Л. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с антимикробным действием. В: *Известия ТСХА*. 2017, №5, с. 41. ISSN (Print) 0021-342X.
174. СТУРОВА, Ю., ЩЕТИНИН, М. Влияние технологических факторов на органолептические показатели сыра. В: *Сыроделие и маслоделие*. 2008, № 1, с. 36-37. ISSN (Print) 2073-4018.
175. ФРИДЕНБЕРГ, Г. Оборудование для производства творога. Обзор современных тенденций. В: *Молочная промышленность*. 2016, №4, с. 51-56. ISSN 1019-8946.
176. ФУРИК, Н., КОНОНОВИЧ, Е., САФРОНЕНКО, Л. Влияние ультрафиолетового облучения на выживаемость бактериофагов молочнокислых бактерий. В: *Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии. Материалы VI международной научной конференции*. Минск, 2008, т. 2, 102 с.
177. ХАМАГАЕВА, И. Разработка технологии детского творога из козьего молока. В: *Пищевая индустрия*. 2012, 3(12), с. 68-71. ISSN (Print) 0235-2486.
178. ШАМАНОВА, Г. Роль молокосвёртывающих ферментов в производстве сыров. В: *Переработка молока*. 2003, № 6, с. 4-5. ISSN (Print) 2222-5455.
179. ЩЕТКО, В., ФЕЩЕНКО, В. Выделение молочнокислых бактерий, перспективных для пищевой промышленности, с целью последующей их идентификации. В: *Вестник Полесского гос. унив. Серия природоведческих наук*. 2015, с.42-48. ISSN 2524-2326.

Brevet de invenție de scurtă durată MD 889 „Procedeu de obținere a brânzei și a băuturii din zer acid (variante)”


REPUBLICA MOLDOVA
Agencia de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ
Nr. 889

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: Procedeu de obținere a brânzei și a băuturii din zer acid (variante)

Titular: INSTITUȚIA PUBLICĂ INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII ALIMENTARE, MD

Data depozit: 2014.06.03
Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

Director General

CHIȘINĂU





Proces verbal de fabricare a loturilor experimentale de bacterii lactice (7 tulpini) din specia *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* și *Streptococcus thermophilus*

ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
MINISTERUL AGRICULTURII ȘI INDUSTRIEI ALIMENTARE
IP INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO - PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI
TEHNOLOGII ALIMENTARE

APROB

Directorul General al IȘP de
Horticultura și Tehnologii Alimentare



C. DADU
2017

PROCES VERBAL DE PRODUCERE

Nr. 3 din 2 iunie 2017

Chișinău, IP IȘPHTA

Noi, subsemnații: șef de laborator Ghenadie COEV, cercetător științific Anatoli CARTAȘEV, Liudmila NECRÎLOVA, am întocmit acest proces verbal, confirmând, că în Laboratorul de biotehnologii alimentare în perioada de 22 mai-29 mai 2017 au fost fabricate loturi experimentale de bacterii lactice din specii *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* și *Streptococcus thermophilus*

(7 tulpini) izolate din lapte crud de capră din diferite regiuni ale RM.

Au fost investigate indicii organoleptici, fizico-chimici și microbiologici.

Mostrele fabricate au fost puse la păstrare (-18°C) în Laboratorul de biotehnologii alimentare.

Caracteristicile mostrelor de tulpini liofilizate sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Caracteristicile mostrelor de tulpini liofilizate

Caracteristici	Tulpini de bacterii lactice						
	CNMN-LB-73	CNMN-LB-74	CNMN-LB-75	CNMN-LB-76	CNMN-LB-77	CNMN-LB-78	CNMN-LB-79
Aspect exterior	Forma de pastilă, întreagă de culoare galbuie						
Fracția masică de umiditate, %	3,0±0,1						
Titrul de bacterii lactice, UFC/ml	10 ⁹						

Coev G.
 Bogdan N.
 Cartășev A.
 Necrîlova L.

Certificat de testare industrială a tulpinilor în cadrul SRL „Major-Auto” (or. Taraclia, Republica Moldova) din 23.03.2017

MAJOR-AUTO SRL	
„MAJOR-AUTO” SRL, Or. Taraclia FTMDMD2X c/f 10076030019659100365	
	"APROB" Directorul SRL "MAJOR-AUTO" E. TANOV
11 aprilie 2017	
CERTIFICAT DE TESTARE INDUSTRIALĂ	
Confirmăm prin prezenta, că în perioada 13-17 martie 2017 am efectuat încercări de testare a culturii de bacterii lactice autohtone din specia <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> LD-77, din specia <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> LL-42, LL-14, LL-77, din specia <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> LC-27, LC-46 și din specia <i>Streptococcus thermophilus</i> ST-56, izolate din laptele de capră crud, în procesul de fabricare a produsului de brânză din lapte de capră, în conformitate cu instrucțiunii tehnologice (67-40388050-001:2017) și a condițiilor tehnice (Standard de firmă 40388050-001:2017) pentru produsul de brânză din lapte de capră avizat de Agenția Națională pentru Siguranța Alimentelor și Ministerul Sănătății al Republicii Moldova, Centrul Național de Sănătate Publică. Confirmăm, că culturile lactice au fost introduse în cantitate necesară conform rețetei de producere pentru produsul de brânză. Confirmăm că caracteristicile organoleptice, fizico-chimice și de inofensivitate ale loturilor de produs au corespund condițiilor stipulate în IT 67- 40388050-001:2017 și SF 40388050-001:2017. Caracteristicile microbiologice: bacterii coliforme, <i>Staphylococcus aureus</i>, microorganisme patogene inclusiv <i>Salmonella ssp.</i>, bacterii din genul <i>Proteus</i> – n-au fost depistate nici într-un lot de produs de brânză cercetate. Numărul de bacterii lactice au manifestat nivelul $10^8 - 10^9$ UFC/g de produs. Loturile fabricate au corespuns condițiilor stipulate în <i>Reguli privind criteriile microbiologice pentru produse alimentare, aprobate prin Hotărârea Guvernului Republicii Moldova nr. 221 din 16.03.2009.</i> Concluzii: 1. Culturile de bacterii lactice autohtone din specia <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> LD-77, din specia <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> LL-42, LL-14, LL-77, din specia <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> LC-27, LC-46, izolate din laptele de capră crud, prezintă interes practic și economic și pot fi utilizate în producere la întreprindere.	
MAJOR-AUTO S.A.	
„MAJOR-AUTO” SRL, Or. Taraclia FTMDMD2X c/f 10076030019659100365	

MAJOR-AUTO SRL

„MAJOR-AUTO” SRL, Or. Taraclia FTMDMD2X c/f 10076030019659100365

2. În prezent utilizarea culturilor de bacterii lactice autohtone din specia *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* LD-77, din specia *Lactococcus lactis ssp. lactis* LL-42, LL-14, LL-77, din specia *Lactococcus lactis ssp. cremoris* LC-27, LC-46, obținute din laptele de capră crud, nu poate fi implimentată din cauza lipsei producerii culturilor starter pentru produsele lactate fermentate din lapte de capră.

Recomandare:

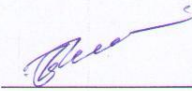
Se recomandă de a organiza producere a culturilor starter pentru fabricarea produselor lactate din lapte de capra și asigurarea întreprinderilor din industria laptelui cu bacteriile lactice autohtone valoroase din punct de vedere biotehnologic și tehnologic.

MAJOR-AUTO S.A.

„MAJOR-AUTO” SRL, Or. Taraclia FTMDMD2X c/f 10076030019659100365

Pagina 2/2

Adeverințe de depozitare a tulpinilor autohtone noi de bacterii lactice

 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	
Bogdan N., Cartășev A., 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)	
<u>Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis LD-77(17)</u>	
destinată utilizării în compoziția culturilor starter pentru fabricarea produselor fermentate din lapte de capră (Genul, specia și destinația tulpinii)	
Numărul de înregistrare, invocat tulpinii depozitate de către Colecție:	
<u>Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis CNMN-LB-73</u>	
Data depozitării: 06.06.2017	
<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. Chiselița



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

Bogdan N., Cartășev A., 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)

Lactococcus lactis ssp. lactis LL-42(17)

destinată utilizării în compoziția culturilor starter pentru
fabricarea produselor fermentate din lapte de capră

(Genul, specia și destinația tulpinii)

Numărul de înregistrare, invocat tulpinii
depozitate de către Colecție:

Lactococcus lactis ssp. lactis CNMN-LB-74

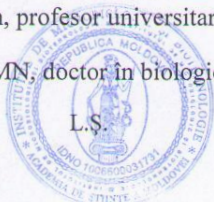
Data depozitării: 06.06.2017

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. Chiselița



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

Bogdan N., Cartășev A., 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)

Lactococcus lactis ssp. lactis LL-14(17)

destinată utilizării în compoziția culturilor starter pentru
fabricarea produselor fermentate din lapte de capră

(Genul, specia și destinația tulpinii)

Numărul de înregistrare, invocat tulpinii
depozitate de către Colecție:

Lactococcus lactis ssp. lactis CNMN-LB-75

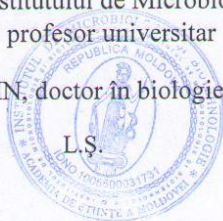
Data depozitării: 06.06.2017

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



[Signature]

V. Rudic

[Signature]

O. Chiselița



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

Bogdan N., Cartășev A., 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)

Lactococcus lactis ssp. lactis LL-77(17)

destinată utilizării în compoziția culturilor starter pentru
fabricarea produselor fermentate din lapte de capră

(Genul, specia și destinația tulpinii)

Numărul de înregistrare, invocat tulpinii
depozitate de către Colecție:

Lactococcus lactis ssp. lactis CNMN-LB-76

Data depozitării: 06.06.2017

Adresa și denumirea colecției:

str. Academiei 1, MD-2028, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie,
Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene (CNMN),
Chișinău, Republica Moldova

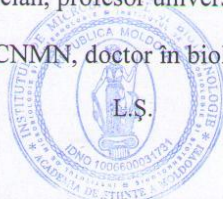
Tel.: (+373 22) 73 96 09

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



[Signature]

V. Rudic

[Signature]

O. Chiselița



**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

Bogdan N., Cartășev A., 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)

Lactococcus lactis ssp. cremoris LC-27(17)

destinată utilizării în compoziția culturilor starter pentru
fabricarea produselor fermentate din lapte de capră

(Genul, specia și destinația tulpinii)

Numărul de înregistrare, invocat tulpinii
depozitate de către Colecție:

Lactococcus lactis ssp. cremoris CNMN-LB-77

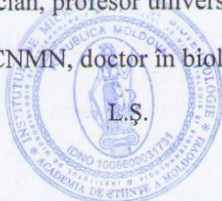
Data depozitării: 06.06.2017

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

V. Rudic

O. Chiselita

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

Bogdan N., Cartășev A., 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)

Lactococcus lactis ssp. cremoris LC-46(17)

destinată utilizării în compoziția culturilor starter pentru
fabricarea produselor fermentate din lapte de capră

(Genul, specia și destinația tulpinii)

Numărul de înregistrare, invocat tulpinii
depozitate de către Colecție:

Lactococcus lactis ssp. cremoris CNMN-LB-78

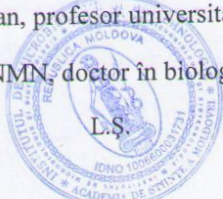
Data depozitării: 06.06.2017

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



[Signature]

V. Rudic

[Signature]

O. Chiselița



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

Bogdan N., Cartașev A., 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-56(17)

destinată utilizării în compoziția culturilor starter pentru
fabricarea produselor fermentate din lapte de capră

(Genul, specia și destinația tulpinii)

Numărul de înregistrare, invocat tulpinii
depozitate de către Colecție:

Streptococcus thermophilus CNMN-LB-79

Data depozitării: 06.06.2017

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: imbenmn@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

Procesul verbal de producere a culturii starter eliberat de DTA a IP IȘPHTA la 06.06.2017

ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
MINISTERUL AGRICULTURII ȘI INDUSTRIEI ALIMENTARE
IP INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO - PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI
TEHNOLOGII ALIMENTARE

APROB

Directorul General al IȘP de
Horticultura și Tehnologii Alimentare

 C. DADU
2017

PROCES VERBAL DE PRODUCERE

Nr. 4 din 12 iunie 2017

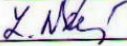
Chișinău, IP IȘPHTA

Noi, subsemnații: șef de laborator Ghenadie COEV, cercetător științific Anatoli CARTAȘEV, Liudmila NECRÎLOVA, am întocmit acest proces verbal, confirmând, că în Laboratorul de biotehnologii alimentare în perioada de 5-8 iunie 2017 în baza tulpinilor autohtone din Colecția Ramurală au fost fabricate un lot de cultura starter pentru brânza:

1. **BriCheese** *L.lactis* CNMN-LB-74, CNMN-LB-75, *L. cremoris* CNMN-LB-78, *L. lactis biovar diacetylactis* CNMN-LB-73, *S. thermophilus* CNMN-LB-79

Caracteristicile culturii 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 Laboratorul de biotehnologii alimentare.

 Coev G.
 Bogdan N.
 Cartașev A.
 Necrîlova L.

Act de implementare a tehnologiei pentru fabricare laptelui de vacă și laptelui de capră de consum pasteurizat eliberat de SRL „Prietenia-Agro” (or.Soroca, Republica Moldova) la 15.03. 2017

SRL “Prietenia-Agro” r-l Soroca, sat. Slobozia-Cremene, com. Varancau, c/f 1003607001817,
c/d 222400006100236, c/b VICBMD2×808



“APROB”
Directorul
SRL “Prietenia-Agro”
Alexei Floarea
29/04/2015

ACT DE IMPLEMENATRE Nr. 1

din “15” martie 2015

(contractul Nr. 08/15-02/2014 din “10” decembrie 2014)

Denumirea propunerii pentru implementare:

ELABORAREA TEHNOLOGIEI PENTRU FABRICAREA LAPTELUI DE VACĂ ȘI LAPTELUI DE CAPRĂ DE CONSUM PASTEURIZAT CONFORM STANDARDULUI DE FIRMA SF.38930262-001:2015 ȘI INSTRUCȚIUNII TEHNOLOGICĂ IT MD 67-38930262-001:2015

Autorii: Coev Gh., Negrilova L., Bogdan N.

Instituția unde s-a implementat și perioada de implementare:

SRL “Prietenia-Agro”, perioada 10.12.2014 – 26.12.2014

Investigațiile implementate:

- organizarea fluxului tehnologic: fazele tehnologice la linia de producere de tip „Fermierul NOVA 600” a firmei SRL “Prietenia-Agro”;
- încercarea fluxului tehnologic cu monitorizarea și verificarea punctelor critice a procesului de fabricare;
- producerea loturilor experimentale de lapte de vacă și de lapte de capră de consum pasteurizat cu diferite tipuri de fracții masică de grăsime în asortiment:
 - Lapte de vacă cu fracția masică de grăsime de 1,5 %; 2,5 %; 3,2 %; 3,5 %;
 - Lapte de capră cu fracția masică de grăsime de 2,8 %; 3,2 %; 4,0 %;
- investigații organoleptice, fizico-chimice și microbiologice ale produselor obținute;
- determinarea termenului de valabilitate ale produselor obținute;

În total au fost fabricate 2 loturi de produse în volum de 150 litri: 100 de litri de lapte de vacă și 50 de litre de lapte de capră, ambalate în pungi polimerice cu volumul de 1,0 l

Obiectul lucrărilor de implementare:

Fabricare laptelui de vacă și a laptelui de capră de consum cu diferite tipuri de fracții masică de grăsime, prin procedeu de pasteurizarea directă în pungi polimerice.

Materia primă: lapte crud de vacă și lapte crud de capră.

Standard de firmă SF 40388050-001:2017 pentru fabricarea brânzei din lapte de capră și de oaie

IP INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO - PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI
TEHNOLOGII ALIMENTARE

APROB

Directorul General al IȘP de
Horticultură și Tehnologii Alimentare


C. DADU
"_____" 2017

STANDARD DE FIRMĂ

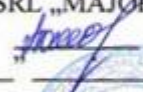
SF 40388050-001:2017

BRÎNZĂ ÎN SARAMURĂ DIN LAPTE DE CAPRĂ ȘI DE OAI
Condiții tehnice

APROB

Directorul

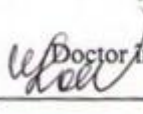
SRL „MAJOR-AUTO”


E. Tanov
"_____" 2017

ELABORAT:
SRL „MAJOR-AUTO”

ISPHTA

Laboratorul de biotehnologii
alimentare


Doctor în biologie
Gh. Coev

Colaborator științific
 A. Cartășev

Colaborator științific
 N. Bogdan

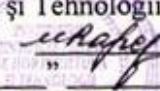
Chișinău 2017

Instrucțiune Tehnologică IT MD 67-40388050-001:2017 pentru fabricarea brânzei din lapte de capră și de oaie

**IP INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO - PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI
TEHNOLOGII ALIMENTARE**

APROB

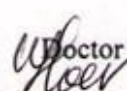
Directorul General al IȘP de
Horticultura și Tehnologii Alimentare

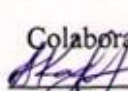

C. DADU
" " " 2017

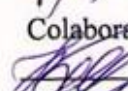
INSTRUCȚIUNE TEHNOLOGICĂ
IT MD 67-40388050-001:2017
pentru fabricarea brânzei din lapte de capră și de oaie
conform SF 40388050-001:2017
(Elaborată prima dată)

ELABORAT:
SRL „Major-Auto”

E. TANOV
" " " 2017
ISPHTA
Laboratorul de biotehnologii
alimentare


Doctor în biologie
Gh. Coev


Colaborator științific
A. Cartășev


Colaborator științific
N. Bogdan

Chișinău 2017

Act de implimentare a tehnologiei pentru fabricarea brânzei din lapte de capră și lapte de oaie eliberat de SRL „Major-Auto” (or. Taraclia, Republica Moldova) la 31.05.2017

„MAJOR-AUTO” SRL,
Or. Taraclia
Fincom bank SA
FTMDMD2X
c/f 10076030019659100365



ACT DE IMPLEMENATRE Nr. 1
din “31” mai 2017
(contractul Nr. 08/15-01/2017 din „1” martie 2017)

Denumirea propunerii pentru implementare:
ELABORAREA TEHNOLOGIEI PENTRU FABRICAREA BRÂNZEI DIN LAPTE DE CAPRĂ ȘI DE OAI E CONFORM STANDARDULUI DE FIRMA SF SF 40388050-001:2017 ȘI INSTRUCȚIUNII TEHNOLOGICĂ IT MD 67- SF 40388050-001:2017

Autorii: Coev Gh., Cartășev A., Bogdan N.

Instituția unde s-a implementat și perioada de implementare:
SRL “ MAJOR-AUTO”, perioada 01.03.2017 – 31.05.2017

Investigațiile implementate:

- organizarea fluxului tehnologic: fazele tehnologice (filtrarea, pasteurizarea, fermentarea, prelucrarea coagulului, presarea, sărarea, maturarea, ambalarea) și utilajul tehnologic privind fabricarea brânzei din lapte de capră și de oaie;
- încercarea fluxului tehnologic cu monitorizarea și verificarea punctelor critice a procesului de fabricare;
- producerea loturilor experimentale de brânza din lapte de capră și de oaie în asortiment:
 - brânză în saramură din lapte de capră integral;
 - brânză în saramură din lapte de oaie integral;
 - brânză în saramură din amestec (50% la 50%) de lapte de capră și de oaie integral;
- investigații organoleptice, fizico-chimice și microbiologice ale produselor obținute.

În total au fost fabricate 3 loturi de produse : brânză sărată din lapte de capră circa 5 kg, brânză sărată din lapte de oaie circa 10 kg, brânză sărată din amestec circa 6 kg, ambalate sub vid în ambalaje din polietilenă multistrat, cu masa neto 700 g.

Obiectul lucrărilor de implementare:

Fabricarea brânzei din lapte de capră și de oaie (în asortiment caș și brânza sărată), obținute prin coagulare cu preparate de coagulare și bacterii lactice, destinate nemijlocit pentru consumul alimentar.

Materia primă: lapte crud de capră și lapte crud de oaie.

Act de implementare a culturii starter în cadrul SRL „Major-Auto” (or. Taraclia, Republica Moldova) din 30.06.2017

CERTIFICAT DE TESTARE la scară semiindustrială
a culturii starter pentru brânza în saramură din lapte de capră

Noi, subsemnații:

Președinte al comisiei:

TANOV E. - Directorul SRL „MAJOR-AUTO”

Membrii comisiei:

Coev Ghenadie - Sef de laborator de biotehnologii alimentare, ISPHTA

Bogdan Nina — Microbiolog, doctorand IMB ASM

Cartășev Anatoli — cercetător științific, Laboratorul de biotehnologii alimentare, ISPHTA

Necrîlova Liudmila - cercetător științific, tehnolog Laboratorul de biotehnologii alimentare, ISPHTA

Confirmăm prin prezenta, că în perioada 19-23 iunie 2017 am efectuat încercări de testare a culturii starter pentru brânza în saramură din lapte de capră, elaborată în cadrul tezei de doctor în Laboratorul de Biotehnologii alimentare al ISPHTA.

Cultura starter a fost formată din tulpini autohtone din specia *Lactococcus lactis ssp. lactis* biovar *diacetylactis* LB-73, din specia *Lactococcus lactis ssp. lactis* LB-74, LB-75, LB-76, din specia *Lactococcus lactis ssp. cremoris* LB-77, LB-78 și din specia *Streptococcus thermophilus* LB-79. Încercările au fost realizate în scara de producere a brânzeturilor la SRL „MAJOR-AUTO”, or. Taraclia în conformitate cu instrucțiunile tehnologice și condițiilor tehnice pentru fabricarea brânzeturilor.

Confirmăm că cultura starter încercată în producere a loturilor experimentale de brânza în saramură corespund cerințelor stipulate în SM 507:2012 Culturi bacteriene concentrate liofilizate pentru produse lactate fermentate. Condiții tehnice. Cultura a asigurat fermentarea laptelui în timp de 6—6,5 ore, numărul de bacterii lactice viabile a fost de 10^9 UFC în 1 cm^3 de produs finit.

Confirmăm că caracteristicile organoleptice, fizico-chimice și microbiologice ale brânzei corespund cerințelor indicate în Reglementarea Tehnica „Lapte și produsele lactate”.

Concluzii:

1. Cultura starter pentru brânza în saramură prezintă interes practic și economic și pot fi implementată în producere produselor lactate fermentate cu investiții minimale la întreprindere.

2. Pentru moment implementarea culturilor starter autohtone este imposibil din cauza absenței producerii concentratelor bacteriene în volum necesar pentru întreprinderile de prelucrare a laptelui de capră.

Recomandare:

Se recomandă organizarea producerii de culturi starter formate din tulpini autohtone de bacteria lactice.

Președinte al comisiei:

TANOV E.

Membrii comisiei:

Coev Ghenadie

Bogdan Nina

Cartășev Anatoli

Necrîlova Liudmila

Brevet de invenție MD 1299 Y „Procedeu de obținere a brânzei din lapte de capră”. Nr. depozit s 2018 0017. Data depozit 15.03.18. Publicat 31.01.2019



MD 1299 Y 2019.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 1299 (13) Y
(51) Int.Cl.: A23C 19/032 (2006.01)
A23C 19/05 (2006.01)
A23C 19/064 (2006.01)
A23C 19/068 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE DE SCURTĂ DURATĂ

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2018 0017 (22) Data depozit: 2018.03.15	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.01.31, BOPI nr. 1/2019
(71) Solicitant: INSTITUȚIA PUBLICĂ INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII ALIMENTARE, MD (72) Inventatori: BOGDAN Nina, MD; NECRÎLOVA Liudmila, MD; CARTAȘEV Anatoli, MD; COEV Ghenadii, MD; RUDIC Valeriu, MD (73) Titular: INSTITUȚIA PUBLICĂ INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII ALIMENTARE, MD	

(54) Procedeu de obținere a brânzei din lapte de capră

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la industria laptelui, și anume la un procedeu de obținere a brânzei de capră.

Procedeu, conform invenției, include pasteurizarea laptelui, adăugarea masei ce conține tulpini de bacterii lactice *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNMN-LB-74, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNMN-LB-75, *Lactococcus*

2
lactis ssp. *cremoris* CNMN-LB-78, *Lactococcus diacetylactis* CNMN-LB-73, *Streptococcus thermophilus* CNMN-LB-79, adăugarea clorurii de calciu și a enzimelor coagulante, separarea coagulului, tăierea acestuia, sărarea și maturarea brânzei.

Revendicări: 2

MD 1299 Y 2019.01.31



Extras din Proces verbal de degustare a sortimentului de brânzeturi din lapte de capră cu conținut de cultura starter din tulpini autohtone

APROB

Directorul General al IȘP de Horticultură și
Tehnologii Alimentare

 C. DADU 2017

EXTRAS
din proces-verbal nr.5
al ședinței comisiei de degustare
din 10 septembrie 2017

Au participat:
Reprezentanții Institutului Științifico - Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare:
Dr. Coev Ghenadie - șef laboratorului de biotehnologii alimentare, președintele comisiei;
Bogdan Nina — cercetător științific
Cartășev Anatoli — cercetător științific
Necrîlova Liudmila - cercetător științific
Grumeza Irina - cercetător științific, secretar comisiei

Reprezentat SRL “MAJOR-AUTO”:
E. Tanov - Directorul SRL “MAJOR-AUTO”

Prezentarea lucrării:
1. Deschiderea ședinței de degustare a fost susținută de șeful laboratorului de biotehnologii alimentare dr. în biologie Coev Gh.
2. Cuvînt pentru prezentare a lucrărilor a lucrărilor efectuate I s-a oferit doctorandului Bogdan N. care a prezentat sortimentul de produse supuse degustării.

Scopul degustării:
Aprecierea sortimentului de brânzeturi fabricate cu utilizare culturii starter elaborată în cadrul tezei de doctor “Valorificarea tulpinelor microbiene izolate din lapte de capra pentru aplicare industrial”.

Obiectul degustării:
1. Brînza din lapte de capră cu cultura starter BreCheese;

2. Brânza din amestec din lapte de capră și lapte de oaie cu cultura starter BreCheese;

Rezultatele degustării:

Rezultatele degustării brânzeturilor sunt prezentate în tabelul 1.

Aprecierea organoleptică generală a mostrelor de brânzeturi:

Tabelul 1. Rezultatele degustării brânzeturilor

Denumirea mostrei	Numele, Prenumele degustatorului						Numarul de note	Suma balurilor	Nota medie
	Tanov E.	Coev Gh.	Bogdan N.	Cartașev A.	Necrițova L.	Grumeza I.			
Brânza din lapte de capră cu cultura starter BreCheese	4,96	4,82	4,9	4,84	4,86	4,9	9	29,24	4,8
Brânza din amestec din lapte de capră și lapte de oaie cu cultura starter BreCheese	4,92	4,9	4,85	4,92	4,84	4,8	9	29,23	4,8

Concluzii:

Toate mostrele de brânzeturi propuse spre degustare sunt admisibile și au fost apreciate cu note medii înalte. Membrii comisiei de degustare au apreciat consistență îmbunătățită a mostrelor, datorită aplicării culturii starter din bacterii lactice autohtone.

Președintele

 Coev G.

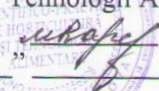
Secretar

 Grumeza I.

Darea de seama referitor la determinarea termenului de valabilitate pentru brânza fabricată cu cultura starter autohtonă din tulpini de bacterii lactice

IP INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO - PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI
TEHNOLOGII ALIMENTARE

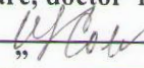
APROB

Directorul General al IȘP de
Horticultură și
Tehnologii Alimentare
 C. Dadu
" " 2017



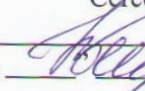
DAREA DE SEAMĂ

referitor la efectuarea cercetărilor privind determinarea termenului
de valabilitate a brânzei în saramură fabricată din lapte de capră cu
aplicare a culturii starter autohtonă pe baza de tulpini
Lactococcus lactis biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis*
Lactococcus cremoris și *Streptococcus thermophilus*

Executorul responsabil:
Șef al laboratorului de biotehnologii
alimentare, doctor în biologie
 G. Coev
" " 2017

" " 2017

Executorii:
Cercetător științific
 A. Cartășev
" " 2017

Cercetător științific
 N. Bogdan
" " 2017

Inginer-chimist
 I. Grumeza
" " 2017

CHIȘINĂU - 2017

Premiul special Infoinvent 2017 pentru cea mai bună invenție creată de un tânăr inventator



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.

Bogdan Nina

Semnătura

Data


1. 11. 2019

CV al Autorului

Nume, prenume

Bogdan Nina

Data și locul nașterii:

1 iunie 1991, or.Florești, R. Moldova

Cetățenie:

R. Moldova

Studii:

2014-2017

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie
doctorand specialitatea 167.01 Biotehnologie, bionanotehnologie

2012-2014

Universitatea de Stat din Moldova, masterand
Diploma de master în Științe ale Naturii

2009-2012

Universitatea de Stat din Moldova, student, licențiat în Biologie

Activitatea profesională:

2014-Prezent

IP Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii
Alimentare, Laboratorul Biotehnologii alimentare, Chișinău
(Republica Moldova), cercetător științific

Stagii:

01.10.2018 – 05.10.2018

Centrul de Metrologie aplicată și Certificare, Chișinău, Moldova
Formarea Profesională Continuă
Calificare profesională, certificat Nr.01332 din 05.10.2018

Domenii de interes științific:

Biotehnologie, Microbiologie. Tehnologia produselor alimentare: dezvoltarea și elaborarea tehnologiilor de procesare a materiei prime agroalimentare de origine vegetală și animală; asigurarea calității și siguranței alimentelor. Microbiologia produselor alimentare.

Participări la proiecte științifice naționale și internaționale:

11.817.04.32A (2011-2014) „Tehnologii inovative de prelucrare a materiei prime agricole, origină vegetală și animalieră”. *Executant*

15.817.05.03A (2015-2019) „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*

Participări la manifestări științifice:

- 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);
- Conferința științifică internațională a doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării



- științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, ediția V-a (Chișinău, Republica Moldova, 2016);
- Conferința științifică a doctoranzilor cu participare internațională „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, ediția VI-a (Chișinău, Republica Moldova, 2017);
 - Conferința națională cu participare internațională „Știința în Nordul Republicii Moldova: Realizări, probleme, perspective”, (Bălți, Republica Moldova, 2017);
 - 83 International scientific conference of young scientist and students “Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution”, NUFT (Kiev, Ukraine, 2017);
 - UGAL INVENT Salonul Inovării și cercetării (Galați, România, 2017),
 - The 10th Edition of EUROINVENT European Exhibition of Creativity and Innovation (Iași, România, 2018),
 - The 20nd Edition of International Exhibition of Inventics “INVENTICA” (Iași, România, 2018).

Lucrări științifice publicate:

5 articole (1- revistă internațională cotate ISI și SCOPUS, 2- reviste recunoscute în străinătate, 2- revistă din Registrul Național al revistelor de profil, categoria B, C; 4- în monoautorat), 3- culegeri, 8 rezumate ale comunicărilor științifice; 1 brevet de invenție de scurtă durată.

Premii și mențiuni:

1. Bursa de excelență a Guvernului Republicii Moldova, 2016.
2. Bursa de excelență acordată de Federația Mondială a Savanților, 2016.
3. Premiul special EIS INFOINVENT „Cea mai bună invenție creată de un tânăr inventator”, 2017.
4. Medalie de argint - The 10th Edition of EUROINVENT European Exhibition of Creativity and Innovation, Iași, România, 2018.
5. Medalie de aur - The 20nd Edition of International Exhibition of Inventics “INVENTICA”, Iași, România, 2018.

Date de contact:

Bogdan Nina, cercetător științific,
Laboratorul Biotehnologii alimentare
IP Institutul științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare
MD 2011, Chișinău, Codru, str. Vierului 59,
Tel.: +373 69856337,
e-mail: nina.bogdan@imb.asm.md