



TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

Valorificarea potențialului unor culturi artisanale de microorganisme pentru obținerea de produse cu funcționalitate ridicată

Doctorand,

Marina PIHUROV (PROCOP)

Conducător științific,

Prof.univ.dr.ing. Gabriela-Elena BAHRIM

Seria I 1: BIOTEHNOLOGII Nr. 19

GALAȚI

2026

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

Valorificarea potențialului unor culturi artisanale de microorganisme pentru obținerea de produse cu funcționalitate ridicată

Doctorand,

Marina PIHUROV (PROCOP)

Președinte

Prof. univ. dr. ing. RÂPEANU Gabriela

Conducător științific,

Prof.univ.dr.ing. Gabriela-Elena BAHRIM

Referenți științifici

Conf. univ. dr. ing. CECLU Liliana

Prof. univ. dr. ing. VICAS Simona

Conf. univ. dr. biolog BARBU Vasilica

Seria I. 1: BIOTEHNOLOGII Nr.19

GALAȚI

2026

Seriile tezelor de doctorat susținute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunt:

Domeniul fundamental ȘTIINȚE INGINEREȘTI

- Seria I 1: **Biotehnologii**
- Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**
- Seria I 3: **Inginerie electrică**
- Seria I 4: **Inginerie industrială**
- Seria I 5: **Ingineria materialelor**
- Seria I 6: **Inginerie mecanică**
- Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**
- Seria I 8: **Ingineria sistemelor**
- Seria I 9: **Inginerie și management în agricultură și dezvoltare rurală**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE SOCIALE

- Seria E 1: **Economie**
- Seria E 2: **Management**
- Seria E 3: **Marketing**
- Seria SSEF: **Știința sportului și educației fizice**
- Seria SJ: **Drept**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE UMANISTE

- Seria U 1: **Filologie- Engleză**
- Seria U 2: **Filologie- Română**
- Seria U 3: **Istorie**
- Seria U 4: **Filologie - Franceză**

Domeniul fundamental MATEMATICĂ ȘI ȘTIINȚE ALE NATURII

- Seria C: **Chimie**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE BIOMEDICALE

- Seria M: **Medicină**
- Seria F: **Farmacie**

Cuprins

Introducere	17
I. STUDIUL DOCUMENTAR - Stadiul actual al cercetărilor în domeniul utilizării culturilor starter artisanale și a produselor derivate pentru obținerea de produse cu proprietăți funcționale	27
1. Prezent și perspective în utilizarea culturilor starter artisanale pentru obținerea de metabiotice	28
1.1. Tranziția de la conceptul de probiotice la inovațiile moderne ale metabioticele	28
1.2. Diversitatea microbiomului și sinergismul consorțiilor microbiene în culturile starter artisanale ca promotori valoroși pentru producerea metabioticele.....	30
1.3. Potențialul metabiotic al consorțiilor simbiotice din microbiomul culturilor starter artisanale.....	39
1.3.1. Fementarea substraturilor neconvenționale.....	39
1.3.2. Potențialul probiotic al culturilor starter artisanale	41
1.3.3. Derivate prebiotice obținute prin activitatea metabolică a culturilor artisanale ...	43
1.3.4. Postbiotice obținute prin activitatea metabolică a culturilor artisanale.....	44
1.3.5. Paraprobiotice derivate din culturi starter artisanale.....	46
1. 4. Formularea unor alimente și ingrediente funcționale pe bază de metabiotice obținute cu culturi starter artisanale.....	49
1.5. Concluzii și perspective	52
II. STUDIUL EXPERIMENTAL	54
2. Izolarea din microbiomul culturilor starter artisanale a unor microorganisme cu aplicații biotehnologice și selecția tulpinilor cu proprietăți bioactive.....	54
2. 1. Introducere.....	54
2. 2. Materiale și metode.....	57
2.2.1. Reactivi și medii de cultură. Medii fermentative formulate	57
2.2.2. Culturi starter artisanale	58
2.2.3. Izolarea din microbiomul culturilor artisanale a unor culturi pure și caracterizarea morfologică.....	59
2.2.4. Selecția și cultivarea tulpinilor de bacterii lactice cu proprietăți fermentative valoroase	59
2.2.5. Identificarea filogenetică a tulpinilor de bacterii lactice selecționate	60
2.2.6. Determinarea capacității acidifiante.....	60
2.2.7. Determinarea activității antimicrobiene.....	60
2.2.8. Determinarea activității antioxidante.....	61

2.2.9. Evaluarea caracteristicilor probiotice a tulpinilor selecționate	62
2.2.10. Analiza statistică pentru interpretarea datelor experimentale	64
2. 3. Rezultate și discuții	64
2.3.1. Izolarea și caracterizarea morfologică a microorganismelor izolate din microbiomul culturilor starter artisanale	64
2.3.2. Selecția unor tulpini de bacterii lactice izolate din microbiomul culturilor starter artisanale pe baza proprietăților bioactive	69
2.3.3. Identificarea filogenetică a tulpinilor de bacterii lactice selecționate.....	74
2.3.4. Evaluarea potențialului probiotic al tulpinilor de bacterii lactice selecționate.....	76
2. 4. Concluzii parțiale.....	82
3. Demonstrarea simbiofuncționalității co-culturilor artisanale în condiții fermentative neconvenționale și caracterizarea produselor fermentate obținute.....	83
3. 1. Introducere.....	83
3. 2. Materiale și metode.....	85
3.2.1. Culturi artisanale. Fermentații cu culturi multiple de consorții artisanale	85
3.2.2. Determinarea capacității acidifiante	86
3.2.3. Determinarea capacității antioxidante și a activității antimicrobiene	86
3.2.4. Cuantificarea acizilor organici din mediile fermentate prin cromatografie HPLC	86
3.2.5. Analiza statistică	87
3. 3. Rezultate și discuții	87
3.3.1. Capacitatea de acidifiere în condiții fermentative neconvenționale a co-culturilor de microorganisme din microbiota culturilor starter artisanale	87
3.3.2. Conținutul în acizi organici al produselor fermentate cu co-culturi artisanale multiple	89
3.3.3. Activitatea antioxidantă a produselor fermentate cu culturi artisanale multiple	93
3.3.4. Activitatea antimicrobiană a produselor fermentate cu culturi artisanale multiple.....	94
3. 4. Concluzii parțiale.....	96
4. Optimizarea proceselor fermentative utilizând consorții multiple de culturi starter artisanale și medii fermentative neconvenționale	98
4.1. Fermentații cu culturi simbiotice, în consorții multiple, din granule de chefir de lapte și membrane SCOBY	98
4.1.1. Materiale și metode.....	99
Reactivi, medii de cultură și materii prime	99

Multiplicarea granulelor de chefir de lapte	99
Multiplicarea membranelor SCOBY	99
Co-fermentarea cu cultură starter liofilizată multiplă, formată din SCOBY și granule de chefir de lapte	100
Obținerea pudrei liofilizate din proba optimizată	100
Determinarea pH-ului și a acidității titrabile.....	100
Evaluarea proprietăților antifungice și antibacteriene ale produsului fermentat	100
Evaluarea proprietăților antioxidante ale produsului fermentat.....	101
Analiza acizilor organici și a compușilor polifenolici în produsul fermentat.....	101
Proiectarea statistică a experimentelor și optimizarea procesului fermentativ	102
▪ Selecția parametrilor biotehnologici cu impact în obținerea de postbiotice utilizând tehnica Plackett-Burman	102
▪ Optimizarea procesului fermentativ prin metoda analizei suprafeței de răspuns.....	103
Analiza statistică	103
4.1.2. Rezultate și discuții	103
Selecția parametrilor biotehnologici cu influență asupra procesului fermentativ	103
Optimizarea procesului fermentativ în vederea creșterii concentrației de compuși bioactivi	108
Caracteristicile produsului fermentat obținut în condiții optimizate.....	113
Conținutul de acizi organici.....	113
Conținutul de polifenoli și flavonoide	113
4.1.3. Concluzii parțiale.....	118
4.2. Fermentații cu culturi simbiotice, în consorții multiple, din granule de chefir de apă și membrane SCOBY.....	118
4.2.1. Materiale și metode.....	119
Materiale și reactivi	119
Multiplicarea granulelor de chefir de apă	119
Multiplicarea membranelor SCOBY	119
Obținerea produselor fermentate prin co-fermentarea mediilor neconvenționale cu granule de chefir de apă și membrane SCOBY	119
Analiza caracteristicilor bioactive ale produselor fermentate	119
Proiectarea statistică a experimentelor și optimizarea procesului fermentativ	119
▪ Selecția parametrilor biotehnologici cu impact în obținerea de postbiotice utilizând tehnica Plackett-Burman.....	119

▪ Optimizarea procesului fermentativ prin metoda analizei suprafeței de răspuns	120
Analiza statistică	120
4.2.2. Rezultate și discuții	120
Selecția parametrilor biotehnologici care influențează procesul fermentativ	120
Optimizarea procesului fermentativ	126
Evaluarea proprietăților bioactive ale produsului fermentat obținut în condiții fermentative optimizate	129
Conținutul de acizi organici al produsului fermentat obținut în condiții optimizate	130
Conținutul în polifenoli și flavonoide al produsului fermentat obținut în condiții optimizate	131
4.2.3. Concluzii parțiale	133
5. Obținerea paraprobioticelelor derivate din tulpini de bacterii lactice probiotice selecționate, izolate din microbiomul culturilor artisanale	134
5.1. Introducere	134
5.2. Materiale și metode	136
5.2.1. Reactivarea tulpinilor de bacterii lactice selecționate	136
5.2.2. Obținerea și dimensionarea suspensiei de celule	136
5.2.3. Tratamente pentru obținerea paraprobioticelelor	136
▪ Tratament combinat cu ultrasunete și tratament termic	136
▪ Tratament combinat încălzire ohmică și tratament termic	137
5.2.4. Testarea viabilității celulelor	137
5.2.5. Modelarea cineticii de inactivare a celulelor în vederea obținerii paraprobioticelelor	137
5.2.6. Testarea <i>in vitro</i> a citotoxicității și a activității antitumorale a paraprobioticelelor	138
5.2.7. Analiza statistică	139
5.3. Rezultate și discuții	139
5.3.1. Obținerea paraprobioticelelor prin tratament combinat ultrasunete și tratament termic	139
5.3.2. Obținerea paraprobioticelelor prin tratament combinat, tratament termic și încălzire ohmică	144
5.3.3. Efectul de citotoxicitate și capacitatea antitumorală a paraprobioticelelor	145
5.4. Concluzii parțiale	149
6. Valorificarea potențialului biotic al postbioticelor și paraprobioticelelor	150
6.1. Obținerea și utilizarea unui ingredient cu potențial biotic pentru formularea furajelor cu aplicații în acvacultură	150

6.1.1. Introducere.....	150
6.1.2. Materiale și metode.....	151
Specia de pește utilizată pentru studii și condițiile de creștere	151
Obținerea produsului fermentat	151
Formularea furajelor și dieta peștilor	152
Evaluarea impactului fiziologic al furajelor suplimentate cu biongredient cu potențial biotic.....	152
6.1.3. Rezultate și discuții	152
Caracteristicile produsului fermentat utilizat ca ingredient în furaje	152
Evaluarea efectului postbioticelor asupra creșterii și funcțiilor metabolice ale peștilor	153
6.1.4. Concluzii parțiale.....	155
6.2. Testarea proprietăților bioactive ale paraprobioticelelor utilizând drojdia <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ca organism model	155
6.2.1. Introducere.....	155
6.2.2. Materiale și metode.....	156
Obținerea paraprobioticelelor	156
Obținerea și dimensionarea suspensiei de celule de drojdie.....	156
Condițiile de cultivare a drojdiei	156
Determinarea randamentului de biomasă substanță uscată.....	156
Evaluarea comportamentului metabolic al drojdiei în medii suplimentate cu paraprobiotice	157
Stabilitatea drojdiei în timpul depozitării în prezența paraprobioticelelor.....	157
Evaluarea capacității fermentative a drojdiei în prezența paraprobioticelelor	157
6.2.3. Rezultate și discuții	158
Analiza dinamicii și cinetica multiplicării celulelor de drojdie.....	158
Evaluarea activității fermentative a drojdiei în prezența paraprobioticelelor.....	161
Efectul paraprobioticelelor asupra viabilității celulelor la depozitare.....	161
6.2.4. Concluzii parțiale.....	162
6.3. Valorificarea paraprobioticelelor pentru obținerea unei băuturi fermentate, cu potențial funcțional, pe bază de maia din făină de secară și zaț de cafea	162
6.3.1. Introducere.....	162
6.3.2. Materiale și metode.....	163
Formularea substratului fermentativ	163
Analiza proprietăților bioactive ale băuturii fermentate	163

Analiza compușilor polifenolici	165
Analiza statistică	165
Analiza senzorială	165
6.3.3. Rezultate și discuții	166
Proprietățile bioactive ale băuturii fermentate	166
Conținutul de compuși polifenolici.....	168
Proprietățile senzoriale ale băuturii fermentate.....	169
6.3.4. Concluzii parțiale.....	170
7. Concluzii finale.....	171
8. Contribuții originale și perspective de continuare a cercetărilor.....	174
9. Diseminarea rezultatelor	176
Bibliografie	179
ANEXA 1	196
ANEXA 2	199

Introducere

În prezent, înțelegerea științifică a proceselor fermentative s-a extins considerabil, incluzând o cunoaștere detaliată a proceselor biochimice și a biocatalizatorilor implicați. În industria alimentară și în alimentație, aceste procese contribuie la creșterea valorii nutritive și funcționale a alimentelor, prin implicarea unor culturi starter de microorganisme, cu potențial probiotic și a produselor derivate, pre-, post- și paraprobioticele, incluse recent în noul concept metabiotice. Aceste componente au un potențial benefic important pentru sănătate, manifestat prin modularea microbiotei intestinale, susținerea diversității microbiene, întărirea barierei intestinale și menținerea echilibrului general al sistemului gastrointestinal. Totodată, studiile recente au evidențiat efecte pozitive ale consumului de alimente fermentate asupra unor afecțiuni cronice, precum bolile cardiovasculare, obezitatea, diabetul, sindromul metabolic, bolile neuro-degenerative etc. (Biswas & Das Mohapatra, 2023; Torre et al., 2025).

Interesul în creștere pentru produsele funcționale fermentate folosind culturi artisanale cum ar fi membranele de kombucha și granulele de chefir (lapte și apă) a condus la intensificarea cercetărilor asupra proprietăților lor bioactive. Pe scurt, toate cele trei consorții de microorganisme sălbatice au în comun în componența microbiotei lor, consorții de bacterii lactice, acetice și drojdii, însă cu o largă diversitate de genuri și specii și în proporții diferite. În microbiota granulelor de chefir de lapte (GCL) predomină bacteriile lactice, urmate de drojdii și, mai rar, bacteriile acetice. În microbiomul granulelor de chefir de apă (GCA), drojdiile sunt cele mai numeroase, urmate de bacteriile lactice și într-o proporție mai redusă, de bacteriile acetice. În cazul consorțiului asociat membranelor de kombucha (engl. SCOBY- *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*), bacteriile acetice sunt cele predominante, urmate de drojdii și, mai rar, de bacterii lactice. Astfel, în culturile artisanale, bacteriile lactice predominante aparțin genurilor *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. și *Leuconostoc* spp., dar și *Bifidobacterium* spp. Unele specii au fost redenumite conform noii taxonomii (Zheng et al., 2020). Printre drojdii, se regăsesc genurile *Saccharomyces* spp., *Brettanomyces* spp., *Kloeckera* spp., *Saccharomycodes* spp., *Schizosaccharomyces* spp., *Torulaspora* spp., *Zygosaccharomyces* spp., *Kluyveromyces* spp., și *Candida* spp.. În ceea ce privește bacteriile acetice, cele mai frecvente aparțin genurilor *Acetobacter* spp., *Gluconobacter* spp. și *Komagataeibacter* spp. (Ding, Krasilnikova, et al., 2022; Ding, Stoyanova, et al., 2022b).

În prezent, o multitudine de tulpini de microorganisme indigene, izolate din aceste consorții, este utilizată în producția de alimente, furaje și ingrediente funcționale. Derivate ale acestor microorganisme probiotice sunt valorificate în formularea suplimentelor alimentare, a furajelor, a produselor funcționale, precum și a ingredientelor utilizate în industria farmaceutică și cosmetică, datorită multiplelor lor efecte bioactive benefice *in vitro* și *in vivo*, precum activitatea antimicrobiană și antioxidantă, efectele antiinflamatoare, anticancerigene, antihipertensive, antidiabetice și hepatoprotectoare (da Anunciação et al., 2024).

Datorită diversității microorganismelor din consorțiile naturale, acestea pot transforma atât pe substraturi convenționale, precum ceaiul negru sau verde cu adaos de zahăr (pentru kombucha), apa suplimentată cu fructe uscate, cu zahăr (pentru GCA) sau lapte (pentru GCL), cât și substraturi neconvenționale, cum ar fi infuziile din plante medicinale (pentru kombucha sau GCA), sucuri de fructe sau apă de cocos (pentru GCA), lapte vegetal, zer sau colostru (pentru GCL), dar și substraturi derivate din cereale, inclusiv cele aglutenice (hrișcă, quinoa,

etc.), leguminoase (linte, năut etc). De asemenea, subprodusele agro-alimentare, precum coji de cartof dulce, okara, pulpe de fructe sau resturi de legume, sunt utilizate cu succes ca substraturi în procesele fermentative (Pihurov et al., 2024). Aceste substraturi furnizează nutrienți esențiali pentru microorganisme, incluzând carbohidrați, proteine și alți compuși cu azot, fibre, polifenoli, acizi organici, vitamine și minerale.

Astfel, atât consorțiile artisanale, cât și tulpinile izolate cu potențial probiotic sunt utilizate pentru producerea de produse fermentate funcționale, bogate în postbiotice (ex. acizi grași cu lanț scurt, proteine bioactive, exopolizaharide, vitamine, enzime), și/sau prebiotice (ex., fructooligozaharide, galactooligozaharide, beta-glucani) cu o gamă largă de aplicații. De asemenea, trebuie menționate și paraprobioticele, care se obțin prin inactivarea celulelor prin diferite tratamente (termic, cu ultrasunete, încălzire ohmică, presiuni înalte etc.). Paraprobioticele pot fi ulterior integrate în diverse formule alimentare, îmbunătățind astfel proprietățile bioactive (Aguilar-Toalá et al., 2018; Nataraj et al., 2020; Zang et al., 2024).

Astfel, substraturile fermentate, cu ajutorul tulpinilor probiotice individuale, selecționate, sau a consorțiilor microbiene, contribuie la rezolvarea și prevenirea problemelor de sănătate și sustenabilitate alimentară. În acest context, metabioticele se prezintă ca o alternativă promițătoare, având în vedere că includ celule vii și moarte (intacte sau rupte), componente celulare și metaboliți microbieni formați prin fermentații sau eliberați din celule. Combinarea acestor elemente în formule alimentare și medicinale poate conduce la dezvoltarea unor produse inovative cu efecte terapeutice. Metabioticele obținute prin aportul consorțiilor indigene de microorganisme din microbiomul culturilor starter artisanale, pot reprezenta o direcție inovativă în dezvoltarea a produselor funcționale cu impact deosebit în creșterea calității vieții.

Teza de doctorat intitulată „**Valorificarea potențialului unor culturi artisanale de microorganisme pentru obținerea de produse cu funcționalitate ridicată**” a vizat izolarea și evaluarea potențialului bioactiv al unor tulpini de bacterii lactice din culturi artisanale (membrane de kombucha, GCL și GCA), în culturi pure sau în consorții. De asemenea, s-a urmărit optimizarea proceselor de obținere a unor produse fermentate prin fermentarea unor substraturi neconvenționale utilizând consorții singulare sau prin combinarea microbiotei acestora, având ca scop obținerea de postbiotice cu caracteristici funcționale și diversificarea compozițională și a proprietăților produselor fermentate. În plus, au fost analizate și aplicate tehnici de inactivare a unor tulpini de bacterii lactice izolate din consorțiile studiate în vederea obținerii de paraprobiotice și testarea preliminară a proprietăților bioactive ale acestora. Totodată, s-a pus accent pe valorificarea potențialului postbioticelor și a paraprobioticelelor, prin integrarea acestora în formule funcționale de ingrediente, alimente și furaje.

Cercetările efectuate în cadrul stagiului de doctorat au vizat următoarele obiective științifice generale:

- ✓ Obținerea unor tulpini pure de microorganisme (bacterii lactice, bacterii acetice și drojdii) din microbiomul natural al culturilor starter artisanale, urmată de caracterizarea morfologică, taxonomică și capacitatea de fermentare a unor substraturi neconvenționale (făină din linte roșie, coji de cartof dulce, okara și colostru bovin).

- ✓ Evaluarea și identificarea prin modelare matematică și analiză statistică a parametrilor cheie pentru optimizarea proceselor fermentative, utilizând consorții microbiene multiple, prin co-cultivarea culturilor starter artisanale pe medii neconvenționale.
- ✓ Obținerea paraprobioticelelor din tulpinile selecționate cu potențial probiotic, prin tratamente combinate, tratament termic, încălzire ohmică și tratament cu ultrasunete și testarea proprietăților bioactive ale acestora.
- ✓ Valorificarea potențialului bioactiv al metabioticelelor prin integrarea acestora în alimente și furaje pentru pești.

Lucrarea este organizată în două secțiuni:

I. STUDIUL DOCUMENTAR, intitulat **„Stadiul actual al cercetărilor în domeniul utilizării culturilor starter artisanale și a produselor derivate pentru obținerea de produse cu proprietăți funcționale”** conține un capitol, cu cinci subcapitole, studiul actual în domeniul analizei și utilizării culturilor starter artisanale (membrane de kombucha, GCL și GCA) și perspectivele privind utilizarea acestora în procese biotehnologice controlate, pentru obținerea de metabiotice, adică complexe funcționale conținând prebiotice, probiotice, postbiotice și paraprobiotice. Astfel, s-a descris componența microbiomului specific fiecărui tip de cultură, potențialul metabiotic și posibilitățile de integrarea produselor fermentate obținute prin aportul culturilor artisanale, în ingrediente și alimente funcționale.

II. STUDIUL EXPERIMENTAL evidențiază rezultatele cercetărilor originale efectuate în decursul perioadei de doctorat, fiind structurat în șase capitole după cum urmează:

Capitolul 2, intitulat **„Izolarea din microbiomul culturilor starter artisanale a unor microorganisme cu aplicații biotehnologice și selecția tulpinilor cu proprietăți bioactive”**, prezintă obținerea și descrierea morfologică a unor culturilor pure izolate din microbiota culturilor starter artisanale (kombucha, GCL și GCA). Ulterior, s-a realizat selecția bacteriilor lactice cu proprietăți fermentative valoroase, urmată de identificarea filogenetică a acestora pentru confirmarea apartenenței la speciile de interes biotehnologic. Tulpinile selecționate au fost testate pentru evaluarea proprietăților bioactive (capacitatea acidifiantă, activitatea antimicrobiană, potențialul antioxidant, precum și potențialul probiotic, inclusiv determinarea activității hemolitice, ca indicator al siguranței pentru utilizare în produse sau suplimente alimentare.

„Demonstrarea simbiofuncționalității co-culturilor artisanale în condiții fermentative neconvenționale și caracterizarea produselor fermentate obținute” prezentate în **Capitolul 3** a avut ca scop utilizarea combinațiilor de culturi artisanale în vederea obținerii unor produse fermentate cu proprietăți bioactive superioare. A fost aplicată o abordare inovativă, care a constat în variația tipului și a dimensiunii inoculului, a compoziției mediului fermentativ și a condițiilor de fermentație, pentru optimizarea procesului în vederea creșterii valorii funcționale a produselor fermentate. Funcționalitatea co-culturilor de tip kombucha – GCA și kombucha – GCL, a potențialului antioxidant și a activității antimicrobiene. De asemenea, în produsele fermentate s-au determinat compuși bioactivi (acizi organici, compuși polifenolici, peptide bioactive), utilizând cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC).

Capitolul 4, intitulat „**Optimizarea proceselor fermentative utilizând consorții multiple de culturi starter artisanale și medii fermentative neconvenționale**”, prezintă strategia de optimizare a procesului de fermentație a unor medii de cultură formulate pe bază de infuzie de ceai negru, unul îmbogățit cu colostru bovin și zahăr, inoculat cu culturi starter obținute din membrane liofilizate de kombucha și GCL, iar altul suplimentat cu stafide și zahăr, inoculat cu culturi starter din membrane liofilizate de kombucha și GCA. Experimentele au fost proiectate și analizate statistic prin modelare matematică, utilizând tehnicile de planificare a experimentelor și optimizare Plackett-Burman și metodologia analizei suprafeței de răspuns. A fost evaluată influența variabilelor independente asupra procesului fermentativ, în corelație cu proprietățile funcționale ale produselor fermentate obținute, precum conținutul de compuși bioactivi (acizi organici, polifenoli și flavonoide), capacitatea antioxidantă și activitatea antimicrobiană.

Capitolul 5, intitulat „**Obținerea paraprobioticelelor derivate din tulpini de bacterii lactice probiotice selecționate, izolate din microbiomul culturilor artisanale**”, prezintă rezultatele testelor de obținere a paraprobioticelelor prin inactivarea celulelor vii ale bacteriilor probiotice, *Lactocaseibacillus paracasei* (MIUG BL80), și *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* (MIUG BL87), utilizând metode combinate precum tratamentul cu ultrasunete–tratament termic și încălzirea ohmică–tratament termic. S-au studiat și modelat matematic cinetica de inactivare a celulelor, având ca scop identificarea celei mai eficiente metode și a celei mai optime variante de procesare pentru obținerea paraprobioticelelor (celule moarte, intacte sau rupte).

Capitolul 6, cu titlul „**Valorificarea potențialului biotic al postbioticelor și paraprobioticelelor**”, a vizat evaluarea proprietăților bioactive ale produsului fermentat obținut prin co-fermentarea cu ajutorul consorțiilor membrane de kombucha și GCL, precum și testarea efectului postbioticelor asupra creșterii și a funcțiilor metabolice ale peștilor, prin suplimentarea furajelor clasice cu produsul fermentat. De asemenea, s-au investigat proprietățile bioactive ale paraprobioticelelor obținute prin tratament combinat ultrasunete–termic, utilizând tulpina de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* ca model experimental. În plus, paraprobioticele au fost integrate în dezvoltarea unei băuturi fermentate cu potențial funcțional, formulată pe bază de maia din făină de secară și zaț de cafea, fiind realizată determinarea conținutului de compuși bioactivi și evaluarea proprietăților bioactive.

Capitolul 7, Concluzii finale, reprezintă concluzii relevante obținute în urma studiilor experimentale realizate, cu privire la: evaluarea microbiotei culturilor artisanale, prin izolarea și caracterizarea tulpinilor pure de bacterii și drojdii; formularea unor produse fermentate prin co-cultivarea consorțiilor de microorganisme din culturi starter artisanale, cu proprietăți tehnologice și funcționale superioare, care au fost evaluate atât în condiții biotehnologice controlate la nivel de laborator, cât și pe organisme vii (pești); obținerea și caracterizarea paraprobioticelelor, urmate de integrarea acestora în procesul de fermentare, conducând la obținerea unei noi băuturi fermentată cu valoare adăugată.

Capitolele ce prezintă studii experimentale sunt organizate mai multe secțiuni: *Introducere*, unde sunt prezentate stadiul actual al cercetărilor în domeniu și sunt definite scopurile experimentelor derulate; *Materialele și metodele* utilizate ce descriu materiile prime, materialele, reactivii utilizați, și metodele experimentale și de evaluare a datelor

experimentale; *Rezultate și discuții*, în care rezultatele obținute sunt prezentate și discutate în contextul literaturii de specialitate; *Concluzii parțiale*.

Referințele bibliografice au fost incluse ca un capitol distinct la finalul tezei, sub titlul *Bibliografie*.

Teza de doctorat are un volum de 201 pagini și include un total de 39 de figuri și 53 de tabele. Componenta teoretică, care prezintă o radiografie a stadiului actual al cercetărilor în domeniul abordat (studiul bibliografic), reprezintă 12,93% din totalul lucrării, iar partea experimentală, în care se prezintă cercetările realizate și rezultatele obținute, reprezintă 87,07% din total.

În încheiere, sunt evidențiate **contribuțiile originale** prin care această teză de doctorat își aduce aportul la îmbogățirea conceptelor fundamentale și aplicative privind aplicațiile culturilor starter artisanale biotehnologie, subiecte relativ puțin studiate în România, precum și direcțiile de continuare a cercetărilor viitoare și modalitățile de diseminare a rezultatelor obținute.

Rezultatele au fost diseminate prin publicarea a **7 articole științifice**, dintre care **6 publicate în reviste cotate ISI** (*Microorganisms, Foods, Applied Sciences, The Annals of the University Dunarea De Jos of Galati, Applied Food Research*), 1 articol publicat în revistă indexată în baze de date internaționale (*Innovative Romanian Food Biotechnology*) și 1 capitol publicat într-o carte apărută în editura internațională (IntechOpen). De asemenea, un număr de 19 lucrări au fost comunicate în cadrul unor manifestări științifice de prestigiu din domeniu, atât la nivel național, cât și internațional.

Activitățile de cercetare desfășurate în cadrul tezei de doctorat au beneficiat de sprijinul infrastructurii moderne de cercetare a *Centrului Integrat de Cercetare, Expertiză și Transfer Tehnologic* (BioAliment-TehnIA) (www.bioaliment.ugal.ro), din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor a Universității „Dunărea de Jos” din Galați.

Pe parcursul studiilor doctorale, doctoranda a fost implicată în echipa unui **proiect** de cercetare, cu tematică complementară cu cea a tezei de doctorat, după cum urmează:

- ✓ **PCE 159/2021-2023** - *Concepte emergente noi pentru funcționalizarea alimentelor, prin tranziția de la probiotice la metabiotice, ca strategie de promovare a sănătății (BIOTICS+;* <https://www.biotics.ugal.ro/index.php/en/>), director de proiect prof.dr.ing. Gabriela-Elena Bahrim

Teza de doctorat a fost realizată sub îndrumarea științifică a doamnei prof. dr. ing. Gabriela-Elena BAHRIM, în calitate de conducător de doctorat, și a comisiei de îndrumare, care a avut următoarea componență: prof. dr. ing. Nicoleta STĂNCIUC, prof. dr. ing. Daniela BORDA, prof. dr. ing. Lorena DEDIU, cercetător științific gradul I, CS.I. dr. biochim. Oana CRĂCIUNESCU.

Capitolul 2. Izolarea din microbiomul culturilor starter artisanale a unor microorganisme cu aplicații biotehnologice și selecția tulpinilor cu proprietăți bioactive

2.1. Introducere

Izolarea microorganismelor cu potențial probiotic din alimentele fermentate, cum ar fi produsele lactate, carnea, legumele și extractele din plante, oferă un avantaj competitiv în utilizarea lor eficientă ca microorganisme starter cu proprietăți funcționale. Aceste microorganisme își mențin caracteristicile probiotice pe parcursul procesului de fermentare, contribuind la obținerea unor produse alimentare cu caracteristici funcționale îmbunătățite, precum și la dezvoltarea suplimentelor și a ingredientelor funcționale (Ntiantiasi & Lianou, 2023).

Culturile starter artisanale, granulele de chefir lapte, granulele de chefir de apă și membrana de kombucha (engl. *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts* - SCOBY), fiind cele mai des utilizate în fermentația diferitor substraturi convenționale și neconvenționale, sunt cunoscute ca o sursă excelentă de microorganisme probiotice (bacterii și drojdii), care funcționează în consorții complexe de microorganisme sălbatice, într-un sinergism perfect, imobilizate în suporturi polimerice naturale specifice, biosintetizate de acestea pentru a asigura microîncapsularea naturală și cu rol de protecție a celulelor față de factorii externi.

In vitro, în produsele fermentate beneficiile aduse de componentele metabiotice (prebiotice, probiotice, postbiotice și paraprobiotice) oferă calități nutriționale și funcționale superioare și totodată efecte benefice cu impact asupra calității, conservabilității și siguranței alimentare. Studiile prezentate în acest capitol au vizat izolarea unor microorganisme performante din microbiomul culturilor starter artisanale în vederea selecției și utilizării în procese fermentative, pe baza proprietăților biotehnologice utile în formularea produselor și ingredientelor funcționale. Izolarea și caracterizarea microorganismelor din aceste culturi oferă oportunități semnificative pentru identificarea tulpinilor cu proprietăți bioactive, cum ar fi activitatea antimicrobiană, activitatea antioxidantă și proprietățile probiotice. S-a vizat selecția unor culturi de bacterii lactice pentru utilizare în fermentarea unor substraturi neconvenționale (colostru bovin, linte roșie, coajă de cartofi dulci și okara), pe baza proprietăților acestora de a crește potențialul bioactiv și funcțional al produselor fermentate. Selecția acestor tulpini este esențială pentru dezvoltarea unor biotehnologii avansate cu implicații în industria alimentară, farmaceutică, cosmetică, agricultură, protecția mediului etc.

Pentru diversificarea produselor și a ingredientelor funcționale, precum și pentru valorificarea unor substraturi fermentative neconvenționale cu potențial benefic în multiplicarea microorganismelor probiotice și în obținerea metaboliților postbiotici cu proprietăți bioactive, în această teză au fost analizate următoarele materii prime: colostrul bovin, făina de linte roșie, făina din coji de cartofi roșii și okara (reziduu rezultat în urma producerii laptelui de soia).

Obiectivele științifice ale studiilor prezentate în acest capitol au vizat izolarea unor microorganisme valoroase din punct de vedere microbiologic, din microbiomul culturilor starter artisanale (GCA, GCL, membrana de kombucha). Studiile s-au axat în principal pe culturi de bacterii lactice, care s-au selecționat pe baza capacității acestora de a fermenta diferite

substraturi neconvenționale în vederea obținerii unor produse fermentate cu proprietăți bioactive, selecția, identificarea taxonomică și testarea potențialului probiotic.

2. 2. Materiale și metode

2. 2. 1. Reactivi și medii de cultură. Medii fermentative formulate

Metodologia de cercetare a cuprins:

- Izolarea din microbiomul culturilor artisanale a unor culturilor pure și caracterizarea morfologică
- Selecția și cultivarea tulpinilor de bacterii lactice cu proprietăți fermentative valoroase
- Identificarea filogenică a tulpinilor de bacterii lactice selecționate
- Evaluarea caracteristicilor probiotice a tulpinilor selecționate

2. 3. Rezultate și discuții

2.3.1. Izolarea și caracterizarea morfologică a microorganismelor izolate din microbiomul culturilor starter artisanale

Un număr de 18 tulpini de bacterii lactice, capabile să se dezvolte în condiții de aerobioză și facultativ anaerobioză, au fost izolate, din microbiota culturilor artisanale (kombucha, GCA și GCL).

Din mediul fermentat cu membrane de kombucha au fost izolate două tulpini de bacterii acetice, codificate MIUG BA 1 și MIUG BA 2, prin cultivare pe mediile GYC și Carr, specifice genurilor *Gluconobacter* spp. și *Acetobacter* spp. În plus, tipul bacteriilor acetice prezente în kombucha influențează formarea acizilor organici, cum ar fi acidul gluconic și acidul acetic care contribuie la calitatea funcțională a băuturii fermentate. Un studiu a testat formularea unui consorțiu de culturi microbiene pentru a iniția fermentația pentru obținerea băuturii kombucha. Astfel, a fost propus un amestec de tulpini precum *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Leuconostoc mesenteroides*. Astfel, *A. pasteurianus* are un potențial ridicat în producția de acid acetic și celuloză bacteriană, astfel oferind un mediu optim pentru producția de kombucha fermentată. Iar, *G. oxydans* are potențialul de a furniza efecte bioactive, prin bioproducerea unor postbiotice precum acidul gluconic și acidul glucuronic. Prin urmare, în mediul fermentat de bacterii s-au detectat 10,32 mg/mL de acid glucuronic și 25,49 mg/mL de gluconat (Lee et al., 2023).

Din microbiomul culturilor artisanale au fost izolate 7 tulpini de drojdii, dintre care 3 tulpini din kombucha (codificate MIUG D137, MIUG D138, MIUG D139), 3 tulpini din GCL (codificate MIUG D140, MIUG D141, MIUG D142), și o tulpină din GCA (codificată MIUG D143).

2.3.2. Selecția unor tulpini de bacterii lactice izolate din microbiomul culturilor starter artisanale pe baza proprietăților bioactive

Utilizarea culturilor selecționate de bacterii lactice, izolate din microbiomul culturilor starter artisanale, pentru fermentarea substraturilor neconvenționale, făina din linte roșie, făina din coajă de cartofi roșii, okara și colostru bovin au condus la obținerea de produse fermentate cu proprietăți bioactive valoroase. Astfel, mediul fermentativ formulat din 5% făină de linte roșie, 4% făină din coajă de cartof dulce și 3% okara (codificat LCO 543) fermentat cu bacteriile izolate a avut următoarele caracteristici, și anume: valoarea pH-ului mediului

fermentat a variat în intervalul 3,69 – 4,60, aciditatea totală titrabilă între 4,87 și 16,01 mL NaOH, 0,1 N, potențialul antioxidant între 1,43 - 2,45 mM ET/mL iar pentru activitatea antibacteriană au fost măsurate valori ale zonei de inhibare a dezvoltării bacteriei sporulate, *Bacillus subtilis* MIUG B1, cuprinse între 0,50 – 4,83 mm. Produsele fermentate, obținute cu tulpinile de bacterii lactice codificate MIUG BL79, MIUG BL80, MIUG BL87 și MIUG BL89, au prezentat valori ridicate ale acidității titrabile, cuprinse în intervalul 15,72 – 16,01 mL NaOH 0,1N. Activitatea antioxidantă s-a încadrat între 2,12 – 2,39 mM ET/mL, iar potențialul antibacterian măsurat a fost în limitele 3,33 – 3,67 mm. Pentru activitatea antifungică nu s-a remarcat prezența unei zone clare de inhibare a creșterii, însă s-a observat inhibarea parțială a capacității de sporulare a tulpinii indicator (*Aspergillus niger*).

Pentru probele fermentate obținute prin transformarea mediului pe bază de colostru bovin s-au determinat cele mai scăzute valori a pH-ului, în probele fermentate cu tulpinile de bacterii lactice codificate MIUG BL79, MIUG BL91 și MIUG BL92. În cazul acidității titrabile cele mai mari valori au fost cuprinse între 112,50^oT și 125^oT, pentru produsele fermentate cu bacteriile lactice codificate MIUG BL80, MIUG BL87, MIUG BL91 și MIUG BL92. Cele mai mari valori ale activității antioxidante de 0,96 și 0,72 mM ET/mL au fost raportate în cazul probelor fermentate cu tulpinile codificate MIUG BL90 și MIUG BL83, însă acestea nu au prezentat activitate antibacteriană împotriva tulpinii indicator *Bacillus subtilis* testată.

Produsele fermentate obținute cu tulpinile menționate au prezentat diametrul zonei de inhibiție cuprins între 4,33 și 6,33 mm, iar activitatea antioxidantă a avut valori cuprinse între 0,35 și 0,44 mM ET/mL. Valori de 0,14 mM ET/mL au fost obținute la fermentarea colostrului cu GCL. Pentru *Aspergillus niger*, probele fermentate au inhibat sporularea, cu excepția produsului fermentat obținut cu tulpina codificată MIUG BL 91, care nu a inhibat sporularea mucegaiului.

În urma selecției, pe baza caracteristicilor bioactive a produselor fermentate utilizând substraturi neconvenționale, pe bază de colostru bovin și subproduse agro-alimentare, două tulpini, nou izolate din microbiota culturilor artisanale, codificate MIUG BL 80 și MIUG BL87, au demonstrat proprietăți biotehnologice valoroase pentru producerea de compuși biologic activi (postbiotice).

2.3.3. Identificarea filogenetică a tulpinilor de bacterii lactice selecționate

Identificarea moleculară a celor două tulpini selecționate a evidențiat faptul că tulpinile aparțin genului *Lactobacillus* spp., specia *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lc. paracasei*) MIUG BL80, izolată din granula de chefir de apă și *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* (*Lc. paracasei* subsp. *tolerans*) MIUG BL87, izolată din GCL.

2.3.4. Evaluarea potențialului probiotic al tulpinilor de bacterii lactice selecționate

Tulpinile identificate au fost testate pentru demonstrarea proprietăților probiotice și anume: rezistența în medii cu pH acid, cu săruri biliare și menținerea viabilității în tranzitul gastrointestinal.

Supraviețuirea în medii cu pH 2,0

În studiul bacteriilor izolate din granule de chefir, după 4 ore de termostatare la temperatura de 37^oC, viabilitatea celulelor de bacterii lactice, la pH 2,0, a variat între 3,85 – 2,31 log ufc/mL, gradul de supraviețuire fiind de 40,17 % și 24,72 %, în comparație cu tulpina comercială (*L. casei* ATCC 393) unde nu au fost determinate celule viabile.

Supraviețuirea în medii cu pH 3,0

După 4 ore de termostatare, în mediu MRS, la temperatura de 37°C, viabilitatea celulelor de bacterii lactice, la pH 3,0, a variat între 9,46 – 9,26 log ufc/mL, gradul de supraviețuire fiind de 95,94 % și 99,87 %. În comparație cu tulpina comercială, *L. casei* ATCC 393 al cărei grad de supraviețuire a fost de 92,99 % (Cotârleț et al., 2023).

Supraviețuirea în prezența sărurilor biliare (0,3% g/v)

În cazul bacteriilor lactice studiate, după 4 ore de termostatare la temperatura de 37°C, viabilitatea celulelor de bacterii lactice, în prezența sărurilor biliare (0,3% g/v), a variat între 8,40 – 6,63 log ufc/mL, gradul de supraviețuire fiind de 91,15 % și 74,05 %, în comparație cu tulpina comercială unde nu au fost evidențiate celule viabile, în condiții similare de tratament.

Supraviețuirea bacteriilor lactice selecționate pe parcursul digestiei gastro-intestinale in vitro

Gradul de supraviețuire pentru tulpinile selecționate codificate MIUG BL80 și MIUG BL87, după 190 minute de digestie, au fost de 91,96% (8,70 log ufc/mL) și 60,10% (5,71 log ufc/mL), în comparație cu tulpina comercială (*L. casei* ATCC 393) pentru care nu au fost evidențiate celule viabile, în condiții similare de tratament.

Astfel, s-a efectuat testul de co-agregare ce indică proprietatea celulelor probiotice de a adera la țesutul gazdă, cum ar fi celulele epiteliale din intestinul uman. Astfel, prin co-agregare a fost testată acțiunea tulpinilor selecționate de bacterii lactice împotriva tulpinilor patogene *E. coli* și *S. aureus*. Tulpina cu potențial probiotic codificată MIUG BL 80 a demonstrat un procent de co-agregare ridicat de peste 18%, pentru *E. coli* și 14%, pentru *S. aureus*, ceea ce înseamnă are capacitatea de a împiedica bacteriile patogene de a se coloniza la nivelul intestinului uman.

Tulpinile *Lc. paracasei* MIUG BL80 și *Lc. paracasei* subsp. *tolerans* MIUG BL 87 nu au prezentat activitate hemolitică pentru α - sau β -hemoliză, indicând γ -hemoliză, după cultivare timp de 72 h, la temperatura de 37°C ceea ce presupune a fi sigure, aceasta fiind printre cerințele primare pentru selectarea unei tulpini probiotice.

2. 4. Concluzii parțiale

Consortiile de microorganisme din microbiomul culturilor artisanale, precum membrana de kombucha (SCOBY) și granulele de chefir de apă și lapte, reprezintă o sursă valoroasă și diversificată de tulpini bacteriene și de drojdii cu un potențial probiotic. Pe baza caracteristicilor analizate, respectiv rezistență la pH 2,0 și pH 3,0; capacitatea de supraviețuire în prezența sărurilor biliare (0,3% g/v) cât și în condiții simulate *in vitro* ale digestiei gastro-intestinale, precum și capacitatea de co-agregare a bacteriilor lactice studiate cu tulpini de bacterii patogene și lipsa activității hemolitice, au fost selecționate două tulpini de bacterii lactice cu potențial probiotic, *Lc paracasei* MIUG BL80 și *Lc. paracasei* subsp. *tolerans* MIUG BL 87 considerate tulpini din categoria GRAS. Tulpinile selecționate vor fi studiate în etapele următoare în vederea obținerii de postbiotice și paraprobiotice cu proprietăți bioactive.

Capitolul 3. Demonstrarea simbiofuncționalității co-culturilor artisanale în condiții fermentative neconvenționale și caracterizarea produselor fermentate obținute

3. 1. Introducere

Consoțiile de microorganisme din culturile starter artisanale au o funcționalitate simbiotică perfectă, adaptată în timp, care asigură stabilitatea caracteristicilor produselor fermentate și reproductibilitatea proceselor fermentative și totodată se caracterizează prin stabilitate metabolică deosebită și protecție naturală față de microorganismele de alterare și patogene. Datorită progreselor tehnice a metodelor de investigare biochimică este posibilă identificarea și caracterizarea postbioticelelor, compuși bioactivi funcționali, metaboliți primari și secundari sintetizați de către microorganisme, ca produse extracelulare sau eliberați din celule prin distrugerea acestora, care administrate în cantități adecvate acționează benefic asupra sănătății, care pot prezenta unele avantaje comparativ cu „bioticele” tradiționale, cum sunt probioticele și prebioticele (Wegh et al., 2019). Scopul fermentațiilor utilizând microorganisme multiple, furnizate de consoțiile naturale ale granulelor de chefir de apă/lapte și membrane de kombucha (SCOBY), este de a obține postbiotice diverse în concentrații ridicate, în sensul îmbunătățirii proprietăților funcționale, precum și de a investiga modul în care consoțiile acționează în simbioză pentru a crește funcționalitatea *in vitro* și *in vivo* a produselor fermentate și spectrul de metabiotice produse natural. Postbioticele par a fi candidați buni ca ținte terapeutice noi, în bolile secolului XXI, cum ar fi diabetul, afecțiuni gastrointestinale, afecțiuni hepatice, cancer, depresie și anxietate. Culturile starter artisanale prezintă o serie de particularități din punctul de vedere al capacității de postbioticare care imprimă caracteristicile funcționale ale produselor fermentate (Calvanese et al., 2025).

Obiectivele științifice ale studiilor descrise în acest capitol au vizat:

1. Utilizarea combinațiilor de culturi artisanale pentru obținerea de produse fermentate cu proprietăți bioactive superioare. Această abordare este inovativă prin variația dimensiunii inoculului, a compoziției mediului și a condițiilor fermentative.
2. Demonstrarea funcționalității co-culturilor de culturi artisanale, kombucha - granule de chefir apă și kombucha - GCL.

Această abordare este nouă, întrucât co-cultivarea culturilor artisanale este foarte puțin studiată pe plan național și internațional. Studiul vizează obținerea unor consoții microbiene re-adaptate, capabile să producă o gamă largă de compuși biologic activi (tribiotice; pre-, pro- și postbiotice), în condiții biotehnologice simple și eficiente.

3. 2. Materiale și metode

Au fost utilizate următoarele metode de investigare:

- Fermentații cu culturi multiple de consoții artisanale: co-cultura SCOBY și granule de chefir de lapte și co-cultura SCOBY și granule de chefir de apă;
- Analiza produselor fermentate pentru evidențierea proprietăților bioactive, corelate cu funcționalitatea culturilor starter. S-au evaluat pH-ul, aciditatea totală titrabilă, activitatea antimicrobiană, activitatea antioxidantă și cuantificarea acizilor organici prin cromatografie HPLC.

3. 3. Rezultate și discuții

3.3.1. Capacitatea de acidifiere în condiții fermentative neconvenționale a co-culturilor de microorganisme din microbiota culturilor starter artisanale

Pentru a valida statistic răspunsurile analizate precum și a demonstra diferențele semnificative prezente, s-a formulat ipoteza nulă (H_0) care afirmă că valorile medii ale datelor

analizate pentru cele șase probe testate sunt egale. În cazul în care, valoarea p este mai mică decât nivelul de semnificație de 0,05, se respinge ipoteza nulă, și se acceptă ipoteza alternativă conform căreia sunt diferențe semnificative între probe.

Astfel, testul Tukey pentru varianta experimentală P1, pentru răspunsul pH, indică diferențe semnificative între probe ($p > 0,05$). De asemenea, modelul este adecvat și se potrivește cu datele experimentale, coeficientul de determinare (R^2) fiind de 99,94%.

Valoarea pH-ului la probele martor (fermentații cu culturi individuale de GCL -M2 și SCOBY - M1) a fost de 4,02-4,76, comparativ cu probele în care s-au utilizat co-culturi, acestea având valoarea de 3,17 la a cincea șarjă de fermentație (P5) și valoarea de 3,43, la a treia șarjă de fermentație (P3) (Tabelul 3.1). Scăderea pH-ului se explică prin acumularea de acizi organici, în special acizii lactic și acetic, aceștia fiind produsele finale majore ale metabolismului carbohidraților prin activitatea fermentativă a bacteriile lactice. Acumularea de acid lactic și scăderea pH-ului contribuie la o activitate inhibitoare cu spectru larg împotriva bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative (Sen & Mansell, 2020).

În cazul probelor din a doua variantă experimentală, co-fermentarea mediilor cu GCA și SCOBY, testul Tukey a indicat diferențe semnificative între probe, mai puțin între probele PA1 și MA2, PA3 și PA1, PA7 și PA3. De asemenea, modelul determinat s-a dovedit a fi adecvat datelor experimentale (R^2 - 99,06%). De asemenea, valoarea pH-ului a variat în intervalul 3,4 - 3,6, valorile fiind apropiate de cele ale probele martor (MA1 și MA2).

Tabelul 3.1. Caracteristicile produselor fermentate obținute prin fermentare cu co-culturi artisanale, SCOBY și GCL

Proba	pH	Aciditatea totală titrabilă, mL NaOH 0,1 N	Activitatea antioxidantă, DPPH, mM ET/ mL	Activitate antibacteriană împotriva <i>B.subtilis</i> , mm	Activitate antifungică împotriva <i>A.niger</i> , mm
P1	3,423±0,025 ^c	7,78±0,029 ^d	2,23±0,407 ^{ab}	5,50±0,316 ^c	2,50±0,070 ^b
P3	3,433±0,006 ^c	9,02±0,050 ^c	2,37±0,110 ^a	5,66±0,272 ^c	4,33±0,149 ^a
P5	3,170±0,010 ^e	20,14±0,096 ^a	2,27±0,237 ^{ab}	7,33±0,210 ^b	2,37±0,307 ^{ab}
P7	3,323±0,021 ^d	9,58±0,085 ^b	1,68±0,145 ^{bc}	8,66±0,272 ^a	1,50±0,226 ^b
M1	4,760±0,010 ^a	1,29±0,015 ^e	1,34±0,087 ^c	0,002±0,001 ^d	0,002±0,001 ^c
M2	4,020±0,020 ^b	2,47±0,288 ^e	1,14±0,284 ^c	0,001±0,001 ^d	0,001±0,001 ^c

*Datele reprezintă media a trei determinări independente, iar literele diferite arată diferențe semnificative între probele analizate ($p < 0,05$).

În ceea ce privește aciditatea totală titrabilă (ATT) pentru probele fermentate cu co-cultura SCOBY și GCL din punct de vedere statistic testul Tukey indică că între toate probele sunt diferențe semnificative. De asemenea, modelul obținut s-a dovedit adecvat și se potrivește cu datele experimentale (R^2 -99,97%). Astfel, se observă că, în comparație cu probele martor M1 și M2, în care ATT-ul are valori cuprinse între 1,29 și 2,47 mL NaOH 0,1 N, probele fermentate cu co-culturi artisanale au valori mai ridicate (între 7,78 și 20,14 mL NaOH 0,1 N), ceea ce demonstrează producerea de acizi organici prin fermentație. Proba P5 are valoarea cea mai ridicată 20,14 mL NaOH 0,1 N, acesta fiind proba după a cincea șarjă de fermentație, însă după șarjă a șaptea de fermentație, valoarea ATT a scăzut până la 9,58

mL NaOH 0,1 N, ca urmare a dezvoltării excesive a microorganismelor acidofile sau a microorganismelor care utilizează acizii ca surse de carbon.

Tabelul 3.2. Caracteristicile produselor fermentate obținute prin fermentare cu co-culturi artisanale, SCOBY și GCA

Proba	pH	Aciditatea totală titrabilă, mL NaOH 0,1 N	Activitatea antioxidantă, DPPH, mM ET/ mL	Activitate antibacteriană împotriva <i>B.subtilis</i> , mm	Activitate antifungică împotriva <i>A.niger</i> , mm
PA1	3,40±0,046 ^{bc}	9,69±0,163 ^b	2,46±0,313 ^a	5,00±0,248 ^a	2,33±0,375 ^b
PA3	3,62±0,021 ^{cd}	7,23±0,167 ^c	2,38±0,285 ^a	2,66±0,357 ^b	3,83±0,428 ^b
PA5	3,42±0,015 ^a	11,27±0,482 ^a	2,41±0,336 ^a	4,33±0,383 ^a	3,94±0,542 ^b
PA7	3,47±0,010 ^d	5,53±0,524 ^d	2,36±0,133 ^a	1,66±0,395 ^{bc}	4,00±0,464 ^b
MA1	3,52±0,015 ^e	5,54±0,409 ^d	2,27±0,273 ^a	0,001±0,001 ^c	6,33±0,490 ^a
MA2	3,01±0,006 ^b	8,09±0,103 ^c	2,18±0,244 ^a	5,00±0,621 ^a	0,001±0,001 ^c

*Datele reprezintă media a trei determinări independente, iar literele diferite arată diferențe semnificative între probele analizate ($p < 0,05$).

În probele fermentate cu co-cultura SCOBY și GCA, s-au evidențiat diferențe semnificative, cu excepția probelor codificate PA7 și proba martor MA2 și între PA3 și MA2. Iar, modelul obținut s-a dovedit a fi adecvat și se potrivește cu datele experimentale ($R^2 - 98,16\%$). De asemenea, se observă că probele din șarja întâi de fermentație (PA1) și a cincea șarjă de fermentație (PA5), au prezentat valorile cele mai ridicate ale ATT (9,69 mL NaOH 0,1 N și 11,27 mL NaOH 0,1 N), dar la proba din șarja a 7-a de fermentație (PA7) valoarea ATT s-a redus până la 5,53 mL NaOH 0,1 N, acesta fiind apropiată de proba martor MA1. Reducerea acidității poate indica o scădere a eficienței potențialului, observată după 7 șarje consecutive de fermentație (35 de zile). În această etapă, interacțiunile microbiene devin competitive, apărând dezechilibre în consorțiul microbial multiplu, ceea ce poate conduce la scăderea densității populaționale a unor specii microbiene dominante, implicate în producerea de acizi sau care utilizează acizii în calitate de surse de carbon.

3.3.2. Conținutul în acizi organici al produselor fermentate cu co-culturi artisanale multiple

În produsele fermentate cu co-culturi artisanale, GCL SCOBY în condiții fermentative prezentate anterior, au fost identificați următorii acizi organici, din categoria acizilor grași cu catenă scurtă: acidul propionic, lactic și acetic ce corespund pentru probele din a cincea șarjă de fermentare. Acizii identificați sunt cunoscuți ca având potențial antimicrobial și proprietăți bioactive *in vivo*. În produsele fermentate obținute cu co-culturi de GCA/lapte și SCOBY, există molecule încă a patru compuși importanți care nu s-au putut identifica din cauza lipsei compușilor standard aferenți.

3.3.3. Activitatea antioxidantă a produselor fermentate cu culturi artisanale multiple

Produsele fermentate cu culturi artisanale au proprietăți antioxidante puternice, astfel au rol benefic pentru organismul uman, prin eliminarea și neutralizarea radicalilor liberi, chelarea ionilor de fier și cupru și inhibarea enzimelor din grupul oxidazelor.

Produsele fermentate obținute prin co-culturarea GCL cu SCOBY prezintă o activitate antioxidantă semnificativă din punct de vedere statistic (Tabelul 3.1), comparativ cu variantele în care SCOBY a fost combinat cu GCA, unde diferențele nu au fost statistic semnificative. Iar, testul Tukey arată că între probele martor (M1 și M2) și a treia șarjă de fermentare P3 sunt diferențe semnificative. De asemenea, modelul este adecvat și se potrivește cu datele experimentale fiind de 85,82%. De asemenea, după a treia șarjă de fermentație (P3 cu valoarea de 2,37 mM ET/mL), însă după a șaptea șarjă de fermentație, ca și în cazul acidității, activitatea antioxidantă s-a redus, la valoarea 1,67 mM ET/mL, probele martor prezentând valori de 1,34 mM ET/mL și 1,14 mM ET/mL. În cazul produselor fermentate cu co-cultură de GCA cu kombucha (Tabelul 3.2), s-au obținut valori ale activității antioxidante cuprinse între 2,36 - 2,46 mM ET/mL, în timp ce pentru probele martor valorile au fost mai reduse, de 2,27 mM ET/mL și 2,18 mM ET/mL. Testul Tukey indicând că între probe nu sunt diferențe semnificative statistic.

3.3.4. Activitatea antimicrobiană a produselor fermentate cu culturi artisanale multiple

Pentru produsele fermentate obținute cu co-cultura formată din GCL și SCOBY, testul Tukey a indicat că între probele martor (M1 și M2) și între P3 și P1 nu sunt diferențe semnificative, iar între celelalte probe sunt diferențe semnificative. De asemenea, modelul este adecvat și se potrivește cu datele experimentale (R^2 - 99,72%). Rezultatul a evidențiat zona de inhibiție de 8,66 mm, pentru *Bacillus subtilis* MIUG BL1, aferentă probei din șarja a șaptea de fermentare (P7), iar pentru activitatea antifungică împotriva *Aspergillus niger* cea mai bună valoare de inhibare, de 4,33 mm, s-a obținut pentru proba din a treia șarjă de fermentare (P3). Iar, testul Tukey indică diferențe semnificative între probe, mai puțin între probele martor. De asemenea, modelul este adecvat și se potrivește cu datele experimentale (R^2 - 97,76%). Iar, odată cu creșterea numărului de cicluri de fermentare, crește și activitatea antibacteriană, datorită acumulării în concentrații mari a acizilor, dar și a altor compuși cu efect antimicrobian. Prin urmare, acumularea acizilor determină o activitate antimicrobiană cu spectru larg împotriva bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative. Activitatea antimicrobiană se datorează faptului că formele nedisociate ale acizilor (ex. acidul lactic sau acetic) pătrund în membrana celulelor microbiene, ducând la acidifierea citoplasmei și inhibarea enzimelor esențiale, în special excesului de săruri. La un pH intracelular mai ridicat, acești acizi se disociază și eliberează ioni de hidrogen care perturbă funcții metabolice importante, precum fosforilarea oxidativă și transportul substraturilor (Shen et al., 2018).

În cazul produselor fermentate obținute prin fermentare cu co-culturile GCA și SCOBY, testul Tukey indică diferențe semnificative între probe, cu excepția celor dintre PA1, PA5 și MA2, precum și dintre PA7, PA3 și PA5. Modelul este, de asemenea, adecvat și prezintă o corespondență bună cu datele experimentale, înregistrând un grad de potrivire de 97,24%. În plus, proba din primul ciclu de fermentare (PA1), împreună cu martorul MA2, a prezentat o zonă de inhibiție de 5 mm față de bacteria sporulată *Bacillus subtilis*. În schimb, cea mai mare valoare a activității antifungice (6,33 mm), s-a obținut pentru proba martor fermentată cu SCOBY (MA1), rezultatul poate fi atribuit și compușilor antimicrobieni prezenți în ceaiul negru, microorganismele din microbiota culturii starter singulare se comportă mai bine în mediul de fermentare specific. Astfel, testul Tukey indică diferențe semnificative, cu excepția probelor codificate P5 și P7 și P3. De asemenea, modelul este adecvat și se potrivește cu datele experimentale fiind de 96,87%.

3. 4. Concluzii parțiale

Culturile artisanale (membrane SCOBY, granule de chefir apă și GCL) au fost utilizate în culturi multiple pentru fermentația unor medii neconvenționale pentru a obține produse fermentate cu proprietăți bioactive superioare. Produsele fermentate obținute cu co-cultura formată din 4 % SCOBY și 2 % GCL (în stare liofilizată) pe un mediu de fermentație format din colostru bovin (1%), ceai negru (2%) și zahăr (10%), au demonstrat proprietăți funcționale (potențial antioxidant și antimicrobian) superioare, comparativ cu produsele fermentate cu co-cultura formată din 4% SCOBY și 2% GCA.

Inter-relațiile biologice ce se stabilesc între diferitele specii componente ale microbiotei culturilor artisanale și funcționalitatea biochimică a acestora au de asemenea implicații directe asupra caracteristicilor produselor fermentate.

La fermentarea în șarje succesive, produsul fermentat obținut are proprietăți bioactive variabile (activitatea antioxidantă și activitatea antimicrobiană), în funcție de numărul de repetări al procesului fermentativ și caracteristicile mediului de fermentație (compoziția chimică, pH-ul și metaboliți rezultați prin fermentație), care pot produce schimbări calitative și cantitative ale procesului de bioticare.

Toate aceste variabile independente au fost avute în vedere pentru a fi optimizate prin tehnici de programare a experimentelor, de modelare matematică și analiză statistică, având ca principal obiectiv creșterea potențialului tribiotic al produsului fermentat, prin conținutul de pre-, pro-, postbiotice.

Capitolul 4. Optimizarea proceselor fermentative utilizând consorții multiple de culturi starter artisanale și medii fermentative neconvenționale

4.1. Fermentații cu culturi simbiotice, în consorții multiple, din granule de chefir de lapte și membrane SCOBY

Interesul global pentru consorțiile naturale de microorganisme, cum ar fi granulele de chefir de lapte și membranele SCOBY (kombucha), a crescut semnificativ datorită varietății substanțelor biochimice (postbiotice) pe care le produc, având potențial deosebit pentru aplicații nutriționale, farmaceutice și cosmeceutice. Acestea se remarcă prin stabilitatea și complexitatea potențialului lor metabolic. Mulți dintre metaboliții microbieni sunt molecule bioactive cu proprietăți antibacteriene, anticancerigene și antivirale (Shukla, 2015), precum și alte câteva efecte terapeutice asupra fiziopatologiei organismelor superioare. Acești compuși naturali au demonstrat creșterea interesului privind aplicabilitatea lor, în comparație cu compușii de sinteză chimică, deoarece au potențialul de a fi siguri și netoxici (Ghosh & Sil, 2015). De obicei, metaboliții valoroși sunt obținuți prin fermentarea cu monocultură starter sau cu un amestec de culturi starter (culturi multiple), în condiții biotehnologice controlate (Jawed et al., 2019). Însă, se poate obține o concentrație ridică de compuși biotici (pre-, post- și probiotice) și o largă diversitate compozițională prin fermentarea cu ajutorul consorțiilor naturale de microorganisme din culturile artisanale, precum, GCL și membrane de kombucha (SCOBY), acestea fiind stabile microbiologic și biochimic, fiind capabile să funcționeze într-un perfect sinergism și simbioză (Avila-Reyes et al., 2022). Bacteriile, drojdiile și bacteriofagii încapsulate într-o matrice de exopolizaharide (kefiran), se găsesc predominant în microbiota

GCL. Laptele de vacă este un substrat specific pentru fermentarea granulelor de chefir de lapte. Zerul, colostrul și alte tipuri de lapte sau derivate din lapte sunt utilizate frecvent ca substraturi de fermentație (Ciucan et al., 2021).

Obiectivele studiilor prezentate în acest capitol au vizat optimizarea procesului de fermentație a unui mediu de cultură, formulat pe bază de infuzie de ceai negru, suplimentat cu colostru bovin și zahăr, utilizând culturi starter multiple, formate din membrane SCOBY și GCL. Experimentele au fost proiectate și analizate statistic pe baza modelării matematice prin utilizarea tehnicilor Plackett-Burmann și analiza suprafeței de răspuns (din eng. Response Surface Methodology). A fost analizată influența variabilelor independente selectate (parametrii procesului biotehnologic) cu impact asupra procesului fermentativ, luând în considerare răspunsurile corelate cu proprietățile funcționale ale produsului fermentat, adică conținutul de probiotice (acizi organici, polifenoli și flavonoide), activitatea antimicrobiană și capacitatea antioxidantă.

4.1.1. Materiale și metode

Studiul a fost efectuat utilizând următoarele metode:

- Optimizarea procesului fermentativ a co-culturii de membrană SCOBY liofilizată și granule de chefir de lapte liofilizate prin analiza Plackett-Burman și prin metoda analizei suprafeței de răspuns ;
- Evaluarea potențialului bioactiv: determinarea pH-ului și a acidității titrabile, a proprietăților antifungice și antibacteriene, a proprietăților antioxidante; analiza acizilor organici și a compușilor polifenolici

4.1.2. Rezultate și discuții

Selecția parametrilor biotehnologici cu influență asupra procesului fermentativ

În baza rezultatelor obținute, s-a decis varierea următorilor factori: concentrația de ceai negru între 1-3% (g/v), concentrația de zahăr între 5-10% (g/v), concentrația de colostru bovin 1–5% (g/v), 4 -7 zile, timpul de fermentație, concentrația biofilmului SCOBY liofilizat, între 0,1–0,3% (g/v) și concentrația de GCL liofilizate, între 0,1–0,3% (g/v), în cadrul a 15 variante experimentale generate de program. Valorile obținute pentru răspunsurile analizate, pentru cele 15 probe testate, au variat după cum urmează: 3,50–3,84, pentru pH, 75–187,50°Th, pentru aciditatea titrabilă, 2,06–2,42 mM ET/mL, pentru activitatea antioxidantă, 10,03–14,53 mm zonă de inhibiție, pentru activitatea antibacteriană față de *B. subtilis* și 82,17–86,89% raport de inhibare, pentru activitatea antifungică. Iar, modelul experimental pentru experimentele derulate în acest capitol a fost validat statistic pe baza coeficienților de regresie mai mari de 80% și a valorii $p < 0,05$.

Optimizarea procesului fermentativ în vederea creșterii concentrației de compuși bioactivi

Ținând cont de rezultatele obținute anterior prin analiza Plackett-Burman, pentru analiza suprafeței de răspuns au fost selectați trei parametri semnificativi, pe baza relevanței lor statistice ($p < 0,05$), după cum urmează: concentrația de colostru bovin (A), care a fost variată între 1–5%; concentrația de ceai negru (B) (1–3%) și concentrație de granule liofilizate de chefir de lapte (F) (0,1–0,3%). Cealți factori, concentrația de inoculul SCOBY (0,5%), temperatura (30°C) și timpul de fermentație (5 zile) au fost menținuți constanți, rezultând 20 de variante experimentale. Răspunsurile analizate au fost : pH-ul, aciditatea titrabilă,

activitatea antioxidantă, activitatea antibacteriană, față de *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* și activitatea antifungică față de *A. niger*.

Potențialul de acidifiere a crescut odată cu creșterea concentrației de cultură starter (GCL, liofilizate) și scăderea concentrației de ceai negru. Pentru toate cele 20 de probe analizate, valorile pentru răspunsuri au variat, după cum urmează: 3,38–3,89, pentru pH; 100–344,8°Th, pentru aciditate; 0,91–2,72 mM ET/mL, pentru activitatea antioxidantă; 0–18,50 mm zonă de inhibiție, pentru activitatea antibacteriană (față de *S.aureus*, *B.subtilis* și *E.coli*) și 90,41–100% RI, pentru activitatea antifungică (față de *Aspergillus niger*). Pe baza acestor rezultate obținute s-a modelat un proces optimizat, prin fermentarea unui mediu compus din 6,27% (g/v) pulbere de colostru bovin, 1,64% (g/v) ceai negru, 7,5% (g/v) zahăr, inoculat cu 0,36% (g/v) cultură de GCL și 0,5% (g/v) cultură SCOBY liofilizată, derulat în condiții aerobe, în sistem staționar la temperatura de 30°C, timp de 5 zile.

Activitatea antibacteriană a unui produs fermentat obținut prin fermentare cu SCOBY, s-au raportat valori de 14,5-19 mm zona de inhibiție față de *S. aureus*, *E coli* și *B. cereus* au fost (Al-Mohammadi et al., 2021). Mai mult, o inhibare completă a unor tulpini de *B. cereus*, și parțială a unor tulpini de *S. aureus* și *E. coli* au fost evidențiate pentru un produsul lactat fermentat obținut prin fermentare cu granule de chefir (Kim et al., 2016).

Rezultatele modelului validat au fost prezentate în Tabelul 4.11. Valorile experimentale au fost apropiate de cele preconizate, cu o dezirabilitate de 95% (D), ceea ce înseamnă că efectele individuale și corelate ale parametrilor studiați sunt validate.

Tabelul 4.11. Validarea modelului privind efectul parametrilor biotehnologici studiați asupra proprietăților bioactive ale produsului fermentat

Răspuns	Valoarea estimată	Valoarea experimentală
Aciditate titrabilă, °Th	434,50	456,25±0,16
Activitate antioxidantă, mM ET/mL	2,45	2,42±0,01
Activitate antibacteriană față de <i>E. coli</i> , mm	9,50	8,67±0,10
Activitate antibacteriană față de <i>S. aureus</i> , mm	5,07	8,00±0,22
Activitate antibacteriană față de <i>B. subtilis</i> , mm	21,98	21,67±0,10
Dezirabilitatea	0,95	

Caracteristicile produsului fermentat obținut în condiții optimizate

Produsul fermentat obținut în condiții optimizate a prezentat valoare ridicată a acidității titrabile, o excelentă activitate antibacteriană și proprietăți antioxidante care induc proprietățile funcționale ale acestuia, comparativ cu mediul martor nefermentat cu aciditatea de 12,5±0,05°Th; activitatea antioxidantă de 2,105±0,002 mM ET/mL; fără activitate antimicrobiană detectată). Aceste date au demonstrat că procesul de optimizare cu co-cultura de consorții sălbatice a îmbunătățit proprietățile bioactive ale produsului fermentat.

Concentrațiile de acizi organici și polifenoli, compuși postbiotici formați în produsul fermentat obținut în condiții optimizate de fermentație, au fost evaluate comparativ cu mediul nefermentat (proba martor).

Conținutul de acizi organici

Analiza HPLC a produsului fermentat, obținut în condițiile de fermentație optimizate propuse, a evidențiat zece compuși (Figura 4.3), dintre care cinci acizi organici au fost indentificați, acizii: lactic, citric, acetic, butiric și izovaleric, patru dintre aceștia fiind din categoria acizilor grași cu catenă scurtă, postbiotice extrem de valoroase.

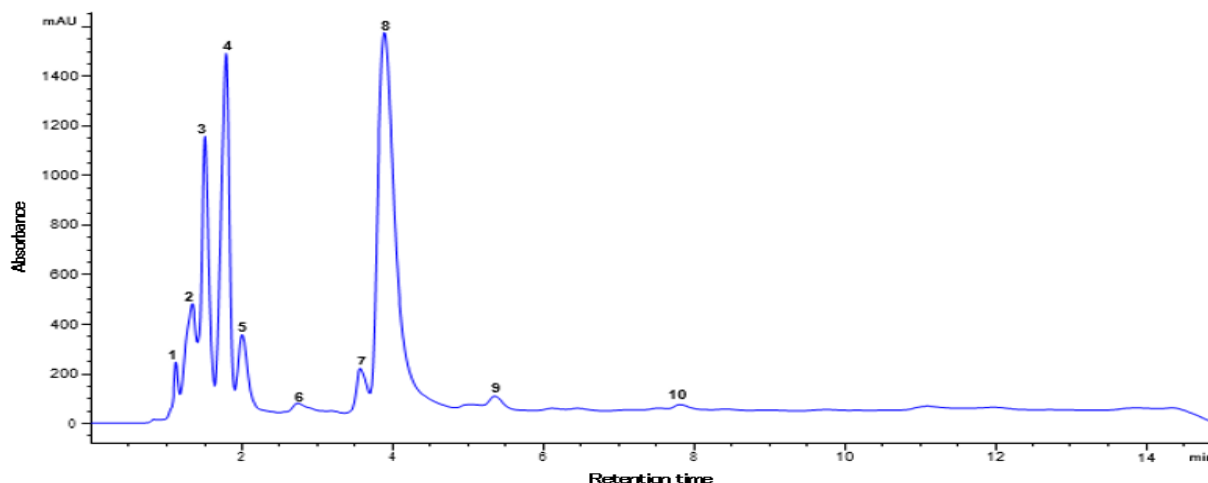


Figura 4.3. Cromatogramă HPLC pentru evidențierea acizilor organici din mediul fermentat. Pikuri: 2 – acid citric; 3 – acid lactic; 4 – acid acetic; 8 – acid butiric; 9 – acid izovaleric; 1, 5 – 7, 10 – acizi organici neidentificați

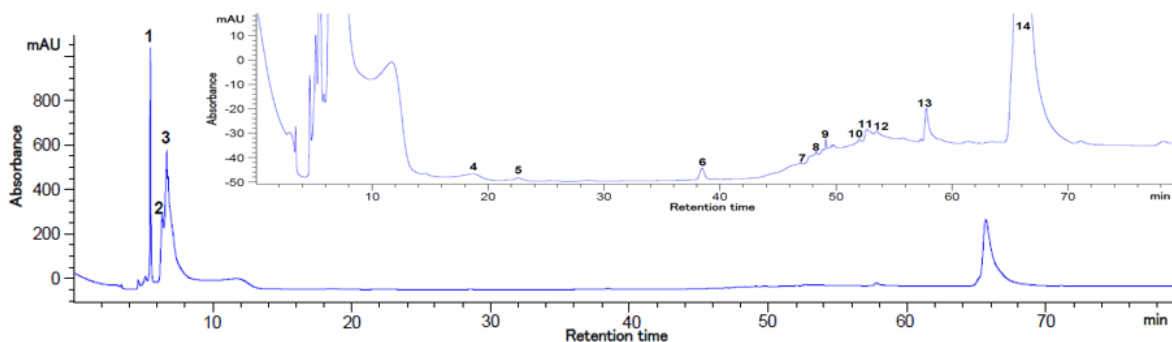
O creștere a concentrației acizilor lactic și acetic a putut fi observată de la 7,77 mg/mL la 24,39 mg/mL, respectiv, de la 9,14 mg/mL la 25,21 mg/mL, în timpul fermentației. A fost detectat și acidul citric (5,77 mg/mL), și nu a putut fi detectat în proba martor (mediu nefermentat). Astfel, comparativ cu proba martor, în produsul fermentat, concentrațiile de acizii lactic și acetic au crescut de până la trei ori, iar acidul citric a rezultat în urma fermentației. Acidul izovaleric a rămas constant la nivelul de 4,36 mg/mL. Acidul butiric a prezentat o mică scădere în timpul fermentației, de la 81,63 mg/mL la 67,33 mg/mL.

Pentru conservare produsul fermentat a fost liofilizat și reanalizat privind conținutul în acizi organici, observându-se o creștere cantitativă a acizilor citric, butiric, izovaleric (ca urmare a creșterii concentrației de substanță uscată) și lipsa acidului acetic (acid volatil).

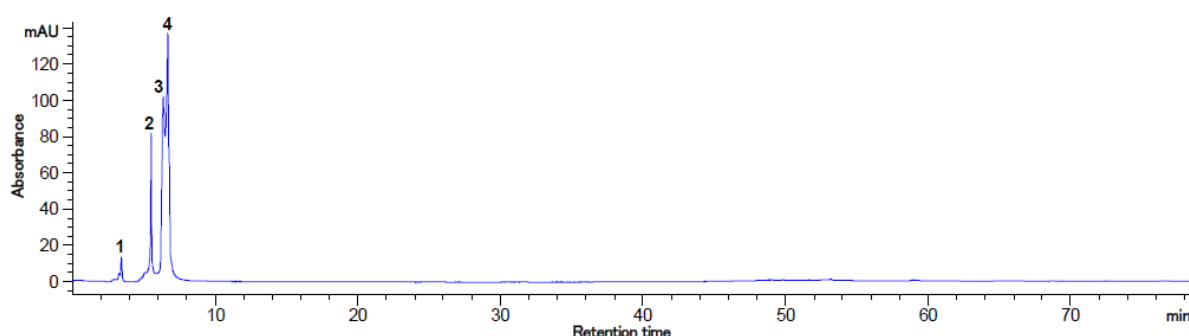
Studiul actual a demonstrat posibilitatea obținerii acizilor grași cu catenă scurtă (lactic, acetic, butiric și izovaleric, recunoscuți ca postbiotice valoroase, prin fermentarea substratului neconvențional (colostru bovin, ceai negru și zahăr) cu tulpini multiple de microorganisme (bacterii lactice, bacterii lactice și drojdii) din microbiota culturilor starter artisanale (GCL și SCOBY; culturi liofilizate).

Conținutul de polifenoli și flavonoide

În proba optimizată au fost detectați 14 compuși la lungimea de undă de 280 nm (Figura 4.4a) și identificați 8, iar la lungimea de undă de 320 nm (Figura 4.4b) au fost identificați 3 compuși, din 4 detectați.



(a)



(b)

Figura 4.4. Cromatogramă HPLC pentru separarea flavonoidelor și a polifenolilor din produsul fermentat (lichid, după fermentare) la lungimile de undă de 280 nm (a) și 320 nm (b). Identificarea peak-urilor: (a) 1 – acid galic; 2 – epicatechină; 3 – acid cafeic; 7 – quercetină; 10 – apigenină; 11 – isorhamnetină; 4 – 6, 8, 9, 12 – 14 – compuși neidentificați; (b) 2 – acid galic; 3 – epicatechină; 4 – acid cafeic; 1 – compus neidentificat.

Principalii compuși fenolici, detectați în produsul fermentat analizat, au fost epicatechina 1062,69 $\mu\text{g/mL}$ și acidul cafeic 314,86 $\mu\text{g/mL}$, urmat de quercetină 18,20 $\mu\text{g/mL}$, izorhamnetină 2,97 $\mu\text{g/mL}$ și apigenină 0,22 $\mu\text{g/mL}$. În timpul fermentației, a putut fi observată bioconversia epicatechinei în galat de epicatechină, epigallocatechină și galat de epigallocatechină. Ca atare, s-a demonstrat că celulele microbiene, sensibile la acid, au eliberat catechinele din ceaiul negru, ceea ce ar putea spori cantitatea de polifenoli din ceaiul fermentat. Conținutul de cofeină al ceaiului negru fermentat cu kombucha a scăzut de la 217,81 $\mu\text{g mL/L}$ până la 100,72 $\mu\text{g mL/L}$ (Ivanișová et al., 2019).

În produsul liofilizat concentrația unor compuși polifenolici se modifică comparativ cu produsul lichid, ca urmare a creșterii conținutului de substanță uscată. Compoziția fenolică a produsului fermentat obținut în condiții optimizate de fermentație a fost corelată cu activitatea antioxidantă, susținând astfel proprietățile funcționale ale acestora.

4.1.3. Concluzii parțiale

Abordarea inovatoare a acestui studiu derivă din utilizarea GCL și a membranelor SCOPY, cu rol de culturi starter multiple, liofilizate, pentru a realiza procese de fermentație în condiții neconvenționale. Astfel, prin corelarea parametrilor biotehnologici specifici fiecărui consorțiu (compoziția mediului, tipul și concentrația inoculului, temperatura și timpul de fermentare), proiectarea experimentelor, modelarea matematică și din analiza statistică au

fost stabilite mai multe variabile independente cu impact asupra proprietăților funcționale ale produsului fermentat.

Rezultatele obținute au demonstrat că microorganismele din microbiota culturilor artisanale studiate, au fost capabile să funcționeze în sinergism și simbioză, amplificând astfel caracteristicile funcționale ale produsului fermentat.

În condițiile biotehnologice testate, cei mai importanți parametri pentru obținerea unui produs fermentat cu funcționalitate crescută au fost stabiliți, după cum urmează: concentrația de colostru bovin, concentrația de infuzie de ceai negru și concentrația granulelor liofilizate de chefir de lapte. De asemenea, un potențial de acidificare superior, o activitate antioxidantă de 2,42 mM ET/mL și respectiv o activitate antibacteriană de 8,0, 8,67 și 21,67 mm față de *S. aureus*, *E. coli* și respectiv *B. subtilis*, au fost detectate pentru produsul fermentat obținut în condițiile optimizate de fermentație. Mai mult, s-a demonstrat că produsul fermentat obținut în aceste condiții conține postbiotice cu potențial funcțional, cum ar fi: acizi organici cu proprietăți funcționale (butiric -67,33 mg/mL, acetic - 25,21 mg/mL, lactic - 24,39 mg/mL, citric - 5,77 mg/mL și acizi izovaleric - 4,36 mg/mL) și compuși polifenolici (acizi galic și cafeic— 7,40 , respectiv, 314,86 μg/mL, epicatechină -1062,69 μg/LI, quercetină - 18,20 μg/mL și izorhamnetina 2,97 μg/mL).

Produsul obținut se recomandă ca bioingredient valoros cu aplicații în formularea alimentelor și a furajelor, cu impact asupra proceselor biochimice din *in vitro* și *in vivo*, cu implicații tehnologice și funcționale deosebite, ce vizează stabilitatea microbiologică, siguranța alimentară și sănătatea consumatorilor.

4.2. Fermentații cu culturi simbiotice, în consorții multiple, din granule de chefir de apă și membrane SCOBY

Culturile artisanale, membranele SCOBY și granulele de chefir de apă (GCA) cuprind în matricele polizaharidice în care sunt imobilizate în mod natural microorganismele din consorțiu, celuloză, respectiv dextran (și o cantitate redusă de levan). Microbiota acestora este formată din bacterii lactice, bacterii acetice, uneori bifidobacterii și drojdii, cu proprietăți probiotice. Prin funcționalitatea lor simbiotică formează în produsele fermentate o gamă largă de metaboliți (prebiotice, postbiotice). Aceste culturi și-au dezvoltat în timp sisteme naturale de protecție împotriva contaminanților (microorganisme saprofite și patogene) (Moretti et al., 2022). Pe lângă faptul că posedă activitate antimicrobiană, produsele fermentate cu granulele de chefir de apă prezintă o activitate biologică pozitivă, și anume, proprietăți funcționale imunomodulatorii, antiinflamatorii (Moreira et al., 2008), antihipertensive, hepatoprotectoare, hipocolesterolemice, antioxidante (M. Alsayadi, Y. Jawfi, 2013). Substratul specific fermentației cu membranele SCOBY pentru obținerea băuturii kombucha este ceaiul negru/verde, în timp ce substratul pentru granulele de chefir de apă este apa cu zahăr și fructe uscate (stafide, smochine, curmale) (Moretti et al., 2022), temperatura de fermentație fiind asemănătoare, 20-25°C. Ideea experimentelor propuse în acest subcapitol este că cele două sisteme simbiotice diferite pot furniza produse fermentate conținând metabiotice (pre-, pro-, post și paraprobiotice) cu o gamă largă de beneficii și aplicații.

4.2.1. Materiale și metode

Metodele experimentale au avut ca scop:

- Obținerea produselor fermentate prin co-fermentarea mediilor neconvenționale cu granule de chefir de apă și membrane SCOBY
- Analiza caracteristicilor bioactive ale produselor fermentate

- Optimizarea procesului fermentativ a co-culturii de membrană SCOBY liofilizată și granule de chefir de apă liofilizate prin analiza Plackett-Burman și prin metoda analizei suprafeței de răspuns

4. 2. 2. Rezultate și discuții

Selecția parametrilor biotehnologici care influențează procesul fermentativ

Selectarea celor mai importanți parametri care influențează procesul de fermentație cu consorții artisanale prin analiza Plackett-Burman

Modelarea statistică prin tehnica PB a generat 15 combinații experimentale utilizând intervalele de variație a factorilor aleși, astfel: concentrația de ceai negru, 1-3% (g/v); concentrația de zahăr, 5-10% (g/v) și concentrația de stafide, 3-6% (g/v); 5 - 7 zile de fermentație; concentrația culturii SCOBY liofilizată, 0,2-0,5% (g/v); concentrația granulelor de chefir de apă liofilizate, 0,2-0,5% (g/v).

Astfel, au fost obținute următoarele variații: 3,46-3,96, pentru pH; 20-225°Th, pentru aciditatea titrabilă; 2,388-2,412 mM ET/mL, pentru activitatea antioxidantă; 0,00-12,67 mm zonă de inhibiție pentru activitatea antibacteriană față de *E. coli*; 0,00-14,00 mm față de *S. Aureus*; 1,50-14,33 mm față de *B. subtilis* și 82,06-100% de inhibiție pentru activitatea antifungică.

Răspunsurile analizate, activitatea antioxidantă și activitatea antibacteriană față de *S. aureus* au fost validate statistic pe baza coeficienților de regresie mai mari de 80% și a valorii probabilității $p < 0,05$.

Optimizarea procesului fermentativ

În urma analizei rezultatelor prin analiza PB, au fost identificați trei parametri cu impact pozitiv asupra procesului biotehnologic, și anume: concentrația de ceai, concentrația de stafide și timpul de fermentație. Ceilalți factori s-au păstrat constanți, după cum urmează: concentrația de inoculul SCOBY liofilizat, 0,2%; concentrația de granule liofilizate de chefir de apă, 0,2%; temperatura, 30°C; timpul de fermentație, 5 zile.

De asemenea, factori precum cantitatea de inocul, concentrația de zahăr și de fructe adăugate, compoziția mediului, concentrația de calciu, cantitatea de oxigen dizolvată în mediul de fermentație, timpul și temperatura de fermentație au fost menționați ca factori cu impact pozitiv în procesul în care s-a utilizat ca inocul GCA, cu beneficii asupra proprietăților bioactive ale produsului finit (Dolores et al., 2022).

Matricea experimentală obținută prin modelul compoziției centrale a generat 20 de variante experimentale, iar răspunsurile analizate au fost: pH-ul, aciditatea titrabilă, activitatea antioxidantă, activitatea antibacteriană față de *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* și activitatea antifungică față de *A. niger*.

Conform modelului compoziției centrale s-au obținut următoarele intervale de valori pentru răspunsurile analizate: 3,42 – 3,97, pentru pH; 51,25 – 158,75°Th (cu excepția probei cu 637,5°Th), pentru aciditate; 2,006 – 2,395 mM ET/mL, pentru activitatea antioxidantă; 0 – 6,67 mm zonă de inhibiție, pentru activitatea antibacteriană față de *E. coli*; 0 – 7,67 mm, pentru activitatea antibacteriană față de *S. aureus*; 5,17 – 18,5 mm, pentru activitatea antibacteriană față de *B. Subtilis*; 70,12-100% grad de inhibiție, pentru activitatea antifungică față de *A. niger*.

În urma aplicării condițiilor optimizate, s-a obținut un produs optimizat cu potențial biologic ridicat, prin co-fermentarea unui mediu compus din 3,52 % (g/v) stafide, 1,0 % (g/v) ceai negru și 5% (g/v) zahăr cu consorțiile microbiene din culturile starter artisanale liofilizate (0,2% (g/v) GCA și 0,2% (g/v) membrană SCOBY, cu termostatare în condiții aerobe, în sistem staționar la temperatura de 30°C, timp de 5 zile.

Evaluarea proprietăților bioactive ale produsului fermentat obținut în condiții fermentative optimizate

Valorile experimentale obținute s-au integrat în intervalul valorilor preconizate de model cu un nivel de încredere de 95%. De asemenea, dezirabilitatea modelului obținut a fost de 0,901, ceea ce indică că aplicând condițiile fermentative optimizate se va obține un impact pozitiv asupra răspunsurilor analizate.

Tabelul 4.28. Validarea parametrilor biotehnologici ai procesului optimizat pentru obținerea produsului fermentat

Răspuns	Intervalul nivelului de încredere de 95%, conform modelului matematic	Valoarea experimentală
pH	3,30 - 3,70	3,25±0,01
Aciditate titrabilă	55,50 – 444,60	375,83±0,02
Dezirabilitatea modelului	0,901	

Produsul fermentat obținut în condiții optimizate s-a caracterizat printr-o valoare ridicată a acidității totale de 375,83°Th și un pH scăzut de 3,25, în comparație cu proba martor (proba nefermentată), care a prezentat o aciditate totală de 9,27°Th și o valoare a pH-ului de 4,69. De asemenea, proba martor (mediul nefermentat, prelucrat în condiții similare cu cele ale probelor fermentate) nu a prezentat activitate antibacteriană, iar cea antifungică a fost foarte redusă (RI-2,68%), în schimb activitatea antioxidantă este mai ridicată (2,507 mM ET/mL), datorită polifenolilor din ceai.

Conținutul de acizi organici al produsului fermentat obținut în condiții optimizate

Utilizând tehnica HPLC s-au identificat, separat și cuantificat compușii prezenți în produsul optimizat nefermentat (proba martor) dar și cel fermentat, atât sub formă lichidă cât și liofilizată.

În produsul fermentat (proba lichidă) s-a evidențiat prezența a 11 compuși (Figura 4.7), dintre care 3 au fost identificați (acidul acetic, butiric și isovaleric), din categoria acizilor grași cu catenă scurtă, recunoscuți pentru proprietățile funcționale deosebite.

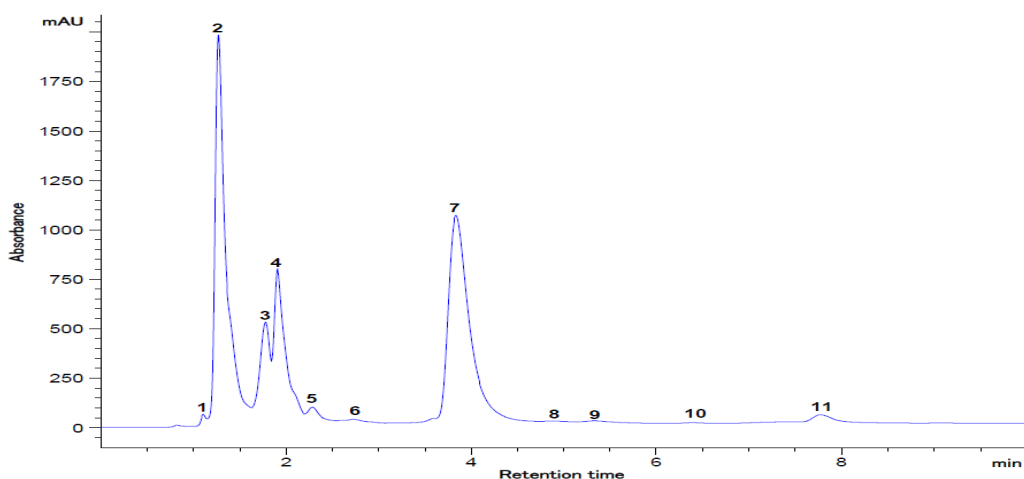


Figura 4. 7. Cromatogramă HPLC ce descrie profilul acizilor organici din produsul fermentat obținut în condiții fermentative optimizate (proba lichidă). Identificarea peak-urilor: 3 – acid acetic; 7 – acid butiric; 9 – acid isovaleric; 1, 2, 4 – 6, 8, 10, 11– acizi organici neidentificați

În proba liofilizată de produs s-a evidențiat prezența a 13 compuși, dintre care au fost identificați 4 (acidul citric, acetic, butiric și isovaleric). În proba martor nefermentată s-a determinat prezența a 12 compuși, dintre care s-au identificat 2 (acidul acetic și butiric). Dintre acizii identificați, acidul acetic este caracteristic pentru kombucha și într-o proporție mai redusă pentru GCA, după fermentare cantitatea acestuia crește de la 4,34 mg/mL la 8,72 mg/mL. În ceea ce privește acidul citric, acesta nu este un compus specific pentru kombucha regasindu-se mai rar în produsul fermentat de SCOBY (Huang et al., 2016) și GCA, acidul fiind identificat doar la proba liofilizată în cantitate de 8,76 mg/g s.u.. Acidul butiric se găsește mai rar în băuturile kombucha, dar totuși prezența acestuia este plauzibilă, astfel, Uțoiu și colab., 2018, au detectat 0,14 g acid butiric/L, după 5 zile de fermentare (Uțoiu et al., 2018), comparativ cu studiul de față, în care cantitatea de acid butiric a crescut prin fermentație de la 37,90 mg/mL la 45,81 mg/mL. Acidul isovaleric este un compus volatil ce contribuie la aroma produsului fermentat, acesta și alți compuși volatili se formează prin sinergia metabolică dintre bacterii acetice și drojdii (de exemplu, *Acetobacter indonesiensis* cu *Brettanomyces bruxellensis*) și poate fi regăsit în cantitate de până la 7000 µg/L (0,007 mg/mL) (Tran, Billet, et al., 2022). În produsul fermentat lichid, obținut în condiții optimizate, acidul isovaleric s-a detectat în cantitate de 0,88 mg/mL, iar în produsul liofilizat, cantitatea este mai mare prin concentrarea acestuia în timpul liofilizării.

Conținutul în polifenoli și flavonoide al produsului fermentat obținut în condiții optimizate

În produsul fermentat obținut în condiții optimizate (lichid, imediat după fermentare) s-au evidențiat, la lungimea de undă de $\lambda=280$ nm, 16 compuși polifenolici (Figura 4.8a), dintre care, în condițiile analitice testate au fost identificați, 6 compuși (acidul galic, epicatechină, rutin trihidrat, acidul cafeic, acidul ferulic, isorhamnetină). Prin analiza produsului fermentat în stare liofilizată, s-au detectat 19 compuși polifenolici, dintre care s-au identificat 6 compuși (acidul galic, acidul clorogenic, rutin trihidrat, acidul vanilic, hesperidină, isorhamnetină). În proba martor s-au determinat 9 compuși polifenolici și doar un compus a fost identificat (acidul cafeic).

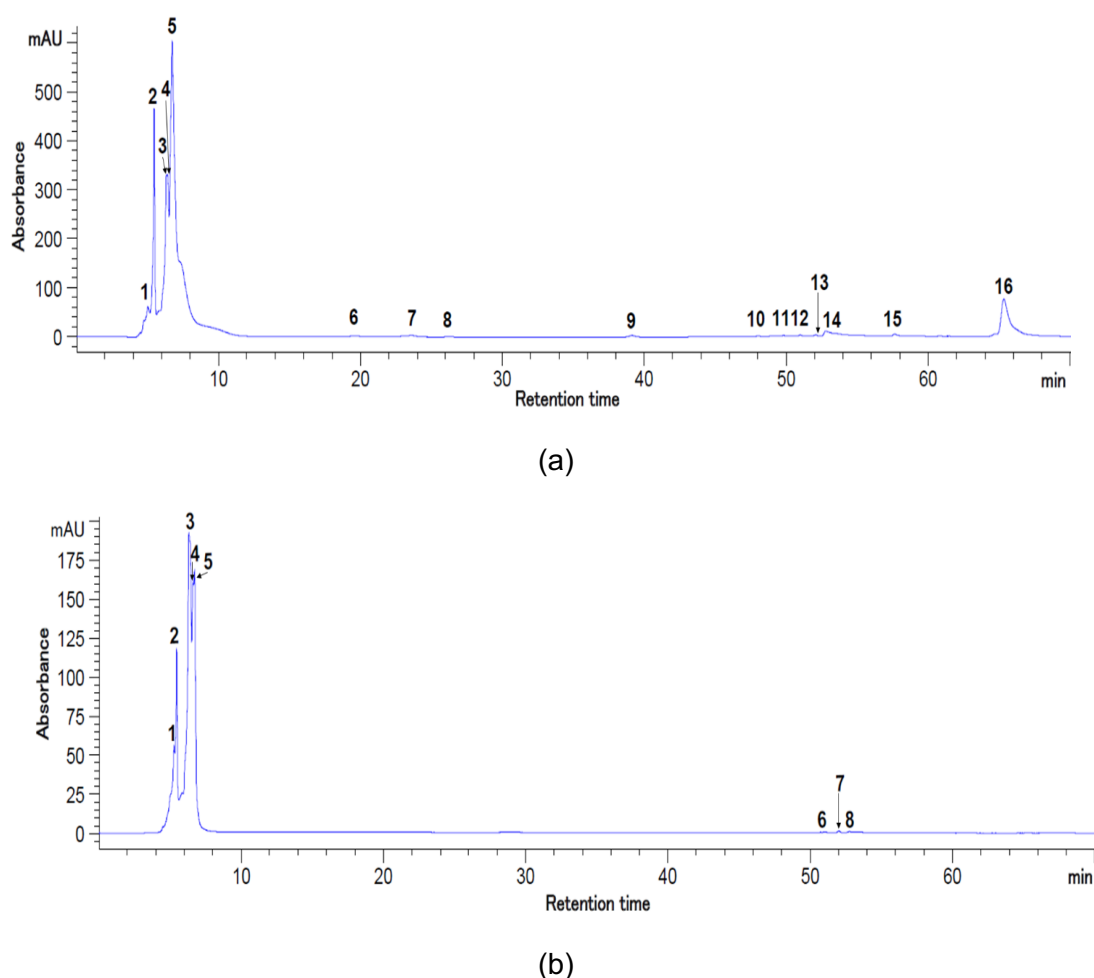


Figura 4.8. Cromatogramă HPLC ce descrie separarea flavonoidelor și a polifenolilor din produsul fermentat (lichid), prin analiză la lungimile de undă 280 nm (a) și 320 nm (b).

Identificarea peak-urilor: (a) 2 – acid galic, 3 – epicatechină, 4 – rutin trihidrat, 5 – acid cafeic, 8 – acid ferulic, 14 – isorhamnetină, 1, 6, 7, 9 – 13, 15, 16 – compuși neidentificați; (b) 2 – acid galic, 3 – acid clorogenic, 4 – epicatechină, 8 – isorhamnetină, 1, 5 – 7 – compuși neidentificați

La lungimea de undă de $\lambda=320$ nm, au fost evidențiați 8 compuși (Figura 4.8b), dintre care 4 identificați (acidul galic, acidul clorogenic, epicatechină, isorhamnetină). În produsul liofilizat s-au evidențiat 18 compuși, dintre care 5 au fost identificați (acidul galic, rutin trihidrat, acidul ferulic, miricetină, hesperidină). În proba martor s-au evidențiat 22 compuși, dintre care 2 au fost identificați (acidul clorogenic, acidul cafeic). Compușii polifenolici majoritari din produsul fermentat obținut în condiții biotehnologice optimizate sunt acid cafeic, 255,64 $\mu\text{g/mL}$, rutin trihidrat, 568,93 $\mu\text{g/mL}$ și epicatechina, 1135,69 $\mu\text{g/mL}$, la lungimea de undă de 280 nm și 828,54 $\mu\text{g/mL}$, la lungimea de undă de 320 nm, dintre care doar acidul cafeic s-a regăsit și în proba martor, în cantitate de 16,80 $\mu\text{g/mL}$, la 280 nm și 1,05 $\mu\text{g/mL}$, la 320 nm, acesta fiind specific ceaiului negru. În cantitate mai mică sunt prezenți acidul galic, isorhamnetina, acidul ferulic și acidul clorogenic. În proba liofilizată s-au identificat 3 compuși: hesperidina, acidul vanilic și miricetină. Unii compuși au fost identificați de Vázquez-Cabral și colab., 2017, în kombucha obținută prin fermentarea ceaiului negru, de exemplu miricetina - 0,184 mg/L, acid galic-54,396 mg/L, acid cafeic -16,213 mg/L, acid clorogenic - 0,539 mg/L,

epicatechină -142,62 mg/L și rutin - 4,245 mg/L. De asemenea, în produsul fermentat cu GCA au fost identificați acidul clorogenic, cafeic, taninuri, vitaminele C și D, glucozide, diverse enzime, inclusiv lipază, amilază și protează (Vázquez-Cabral et al., 2017).

4. 2. 3. Concluzii parțiale

Sudiile demonstrează capacitatea microorganismelor din microbiota culturilor artisanale de a funcționa în co-culturi multiple, în condiții fermentative neconvenționale. În varianta combinării culturilor din SCOBY și GCA, principalele variabile independente (parametri biotehnologici) cu influență asupra proprietăților bioactive ale produsului fermentat s-au dovedit a fi: concentrația de ceai, timpul de fermentare, concentrația de stafide. Astfel, în urma proiectării experimentelor, a modelării matematice și analizei statistice, s-a obținut un produs fermentat cu proprietăți bioactive îmbunătățite, cu un profil funcțional benefic, susținut prin compoziția în postbiotice, acizi grași cu catenă scurtă și polifenoli. Prezența acestor compuși demonstrează potențialul funcțional al produsului fermentat cu potențiale utilizări ca bioingredient în formularea alimentelor, a furajelor sau a unor nutraceutice sau cosmeceutice.

Capitolul 5. Obținerea paraprobioticele derivate din tulpini de bacterii lactice probiotice selecționate, izolate din microbiomul culturilor artisanale

5.1. Introducere

Știința microbiomului uman a adus în prim-plan conceptul de probiotice, microorganisme vii care, atunci când sunt administrate în cantități adecvate, conferă beneficii sănătății gazdei. Însă conceptul de probiotice a evoluat spre metabiotice. Metabioticele, care includ celulele vii, metabolizii și moleculele semnal ale microorganismelor probiotice, au capacitatea de a gestiona o varietate de funcții ale corpului, cum ar fi fiziologia, metabolismul, epigenetica, informațiile, controlul, transportul, imunitatea, neurohormonii și comportamentul. Toate aceste funcții sunt legate de microbiota simbiotică a organismului gazdă (Shenderov et al., 2020a). Metabioticele includ QS-metabiotice (care sunt modulatori ai conceptului *Quorum Sensing* – capacitatea bacteriilor și altor microorganisme de a comunica și coordona comportamentul prin secreția de semnale moleculare), paraprobiotice, postbiotice, prebiotice (Artyukhova & Kozlova, 2019). Astfel, paraprobioticele, cunoscute și sub numele de „probiotice inactivate” sau „probiotice fantomă”, sunt „celule microbiene neviabile (intacte sau rupte) sau extracte celulare brute (cu compoziție chimică complexă), care, atunci când sunt administrate oral sau topic în cantități adecvate, oferă beneficii sănătății consumatorilor umani sau animale. Paraprobioticele au fost raportate a avea numeroase beneficii pentru sănătate, inclusiv reducerea riscului de infecții oportuniste la oameni. Spre deosebire de probioticele tradiționale, care necesită să fie vii pentru a-și exercita efectele benefice, paraprobioticele pot fi mai stabile și mai sigure, reducând riscul de infecții la persoanele vulnerabile. Mecanismul de acțiune al paraprobioticele nu se bazează pe colonizarea tractului intestinal, ci mai degrabă pe interacțiunile directe cu sistemul imunitar sau prin alte căi biochimice. De exemplu, aceste microorganisme inactivate pot stimula sistemul imunitar, pot ajuta la menținerea integrității barierei intestinale sau pot avea efecte antiinflamatoare (Siciliano et al., 2021).

Obținerea de paraprobiotice implică inactivarea celulelor microbiene vii, care poate fi realizată prin mijloace chimice sau fizice, fără a prezenta pericol pentru consumul ulterior al produsului. De obicei, se folosește tratamentul termic, mai rar radiațiile ultraviolete, curentul electric, presiunea înaltă sau ultrasunetele, uneori combinații ale acestora. În timpul procesului

de tratare, structurile celulelor sunt deteriorate, păstrând anumite proprietăți fiziologice. De exemplu, în timpul tratamentului termic, membranele celulelor sunt deteriorate, iar nutrienții și ioni eliberați cauzează agregarea ribozomilor, denaturarea proteinelor și deteriorarea ADN-ului. Astfel, metodele de inactivare a celulelor microbiene influențează semnificativ proprietățile finale ale paraprobioticelelor. În prezent, problema tehnologiei de obținere a paraprobioticelelor cu proprietăți definite rămâne deschisă (Kornienko, 2022).

Două metode moderne utilizate pentru obținerea paraprobioticelelor sunt tratamentul cu ultrasunete și tratamentul ohmic. Aceste metode au fost completate de tratamentul termic pentru asigurarea inactivării totale a celulelor microbiene. Aceste metode diferă în modul în care afectează celula bacteriană și tipul de compuși bioactivi care rezultă din proces. Astfel, *tratamentul cu ultrasunete* presupune utilizarea undelor de presiune cu o frecvență de 20 kHz sau mai ridicată. În general, echipamentele cu ultrasunete utilizează frecvențe de la 20 kHz la 10 MHz, care au capacitatea de a provoca cavitație și de a inactiva celulele în suspensie (Piyasena et al., 2003). *Încălzirea ohmică* este o tehnologie inovatoare utilizată în industria alimentară, inclusiv pentru obținerea de paraprobiotice. Aceasta implică trecerea unui curent electric printr-un material alimentar/suspensie de celule, ceea ce conduce la încălzirea rapidă și uniformă a produsului. Minimizând astfel deteriorarea componentelor nutriționale și organoleptice ale alimentelor (Wang et al., 2021). *Tratamentul termic* este eficient pentru inactivarea diverselor microorganisme, celule vegetative, sporii bacteriilor, drojdii și mucegaiuri, iar fiecare tip de microorganism necesită intensitate diferită a tratamentului termic. Acest model este utilizat pentru a evalua cum variază viteza de inactivare a bacteriilor în funcție de factori precum timpul, temperatura, sau alte condiții de mediu. Comparativ cu modelele clasice, cum ar fi cel logaritmic liniar, modelul Weibull permite o mai corectă prelucrare a datelor experimentale și generarea curbelor de inactivare (Mafart et al., 2002).

Obiectivul principal al studiului prezentat în acest capitol a avut în vedere evaluarea potențialului de obținere a paraprobioticelelor prin inactivarea celulelor unor culturi de bacterii lactice selecționate cu potențial probiotic, izolate din microbiomul culturilor starter artisanale, prin tratamente combinate ultrasunete-tratament termic și încălzire ohmică-tratament termic.

5.2. Materiale și metode

Metodele experimentale în acest capitol au vizat:

- Obținerea paraprobioticelelor (din două tulpini cu potențial probiotic *Lacticaseibacillus paracasei* MIUG BL80 și *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* MIUG BL87) prin tratament combinat cu ultrasunete și tratament termic și tratament combinat încălzire ohmică și tratament termic
- Eficientizarea inactivării celulelor bacteriene prin modelarea cineticii de inactivare a celulelor în vederea obținerii paraprobioticelelor
- Testarea in vitro a citotoxicității (în cadrul liniei celulare stabilizată de fibroblaste murine NCTC, clona L929) și a activității antitumorale (asupra linia celulară HT-29, derivată din adenocarcinom colorectal uman) a paraprobioticelelor. Iar evaluarea viabilității celulare a fost realizată prin testul MTT (bromura de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu) care măsoară activitatea metabolică a celulelor pe baza reducerii colorantului tetrazolic de către dehidrogenazele mitocondriale. Totodată, integritatea membranei celulare, s-a realizat prin dozarea lactat dehidrogenazei (LDH) eliberată în

mediul de cultură. Iar, pentru analiza morfologiei celulare a fost realizată colorația Giemsa, care a fost aplicată ambelor linii celulare.

5.3. Rezultate și discuții

5.3.1. Obținerea paraprobioticeilor prin tratament combinat ultrasunete și tratament termic

În experimentele efectuate, celulele tulpinilor cu potențial probiotic *Lc. paracasei*, codificate MIUG BL 80 și MIUG BL 87 au fost inactivate prin tratament cu ultrasunete cu o reducere de 4 log ufc/ml, urmate de tratament termic.

La tratamentul combinat TUS-TT al tulpinii MIUG BL 87 se observă că inactivarea este mai pronunțată la temperatura de 85°C (Figura 5.1). Astfel, după 5 minute de tratament, la temperatura de 65°C și temperatura de 75°C, se obține o reducere de 1,5 log ufc/ml, respectiv 2 log ufc/ml. După 3 minute, la temperatura de 85°C o reducere de 4,3 log ufc/ml, această reducere fiind după 25 minute, prin tratament termic la temperatura de 75°C. Iar, modelul Weibull, atât în forma propusă de Peleg, cât și cea de Mafart, aplicat inactivării tulpinii codificate MIUG BL 87 prin tratament combinat cu ultrasunete și tratament termic, nu s-a validat din punct de vedere statistic. Având în vedere timpii de inactivare obținuți, varianta optimă pentru asigurarea inactivării complete a celulelor bacteriene ale acestei tulpini constă în procesarea suspensiilor celulare într-un volum de 25 mL prin ultrasunete, la o amplitudine de 80%, timp de 20 de minute, urmată de un tratament termic aplicat pe un volum de 3 mL, la temperatura de 85°C, timp de 20 de minute. Varianta optimă a fost codificată Para87.

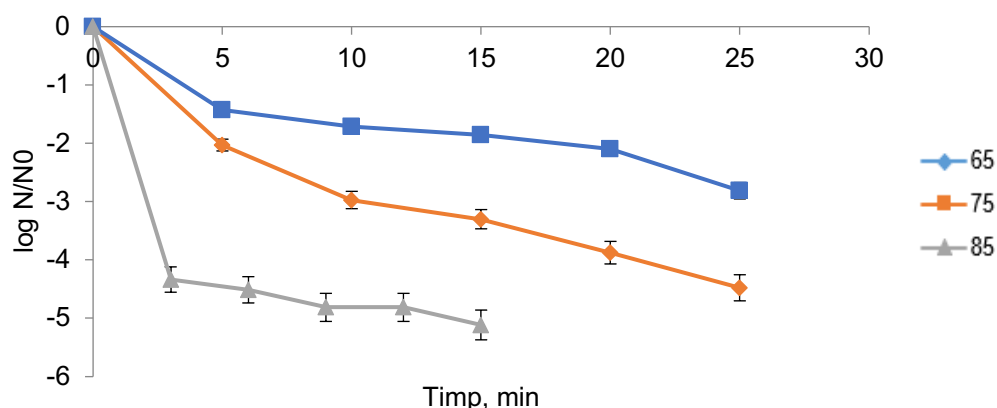


Figura 5.1. Dinamica inactivării celulelor tulpinii MIUG BL 87 prin tratament termic la temperaturile 65°C, 75°C și 85°C, după tratamentul cu ultrasunete

În cele ce urmează se analizează inactivarea celulelor tulpinii codificate MIUG BL 80, care s-a validat statistic prin tratamentele aplicate. Figura 5.2 și Figura 5.3 prezintă dinamica inactivării celulelor prin tratament termic, după tratamentul cu ultrasunete.

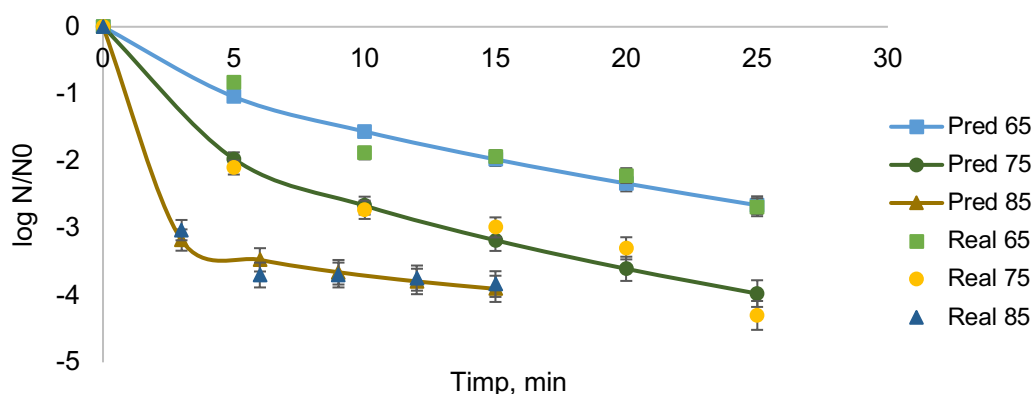


Figura 5.2. Dinamica inactivării logaritmice prin tratament termic a celulelor tulpinii MIUG BL 80 conform modelului Weibull propus de Peleg (Pred- date predicționate; Real- date experimentale)

Din Figura 5.2 se observă că odată cu creșterea temperaturii, inactivarea se intensifică. Prin tratament termic, după tratamentul cu ultraunete, pentru tulpina codificată MIUG BL80, s-a obținut o reducere de 2,5 log ufc/ml, la temperatura de 85°C, după 2 minute, în timp ce la temperatura de 75°C, s-a obținut o reducere de 2,5 log ufc/ml, în 9 minute, iar la temperatura de 65°C, s-a obținut o reducere de 2,5 log ufc/ml, în timp de 23 minute.

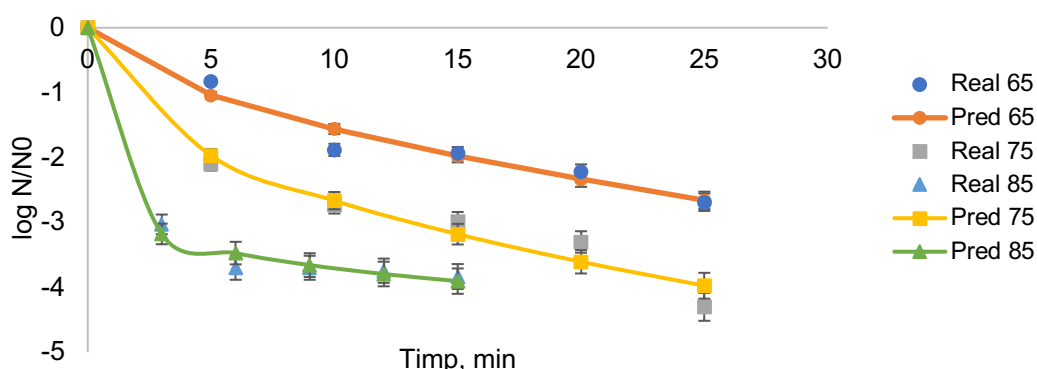


Figura 5.3. Dinamica inactivării logaritmice a tulpinii MIUG BL 80 conform modelului Weibull propus de Mafart (Pred- date predicționate; Real- date experimentale)

Din Figura 5.3 se observă că, la temperatura de 65°C, inactivarea logaritmică a tulpinii MIUG BL 80 duce la o reducere de 2,7 log ufc/ml, după 25 minute de tratament, în timp ce după 5 minute s-a observat o reducere de 1 log ufc/ml. La temperatura de 75°C, după 25 minute de tratament termic, s-a observat o reducere de 4,1 log ufc/ml, iar după 5 minute o reducere de 2 log ufc/ml. La temperatura de 85°C, după 9 minute, s-a obținut o reducere de 3,9 log ufc/ml, iar după 3 minute o reducere de 3 log ufc/ml. De asemenea, conform parametrului n (care descrie concavitatea curbei de supraviețuire), pe o durată mai lungă de timp apare o fracțiune rezistentă la inactivare, fenomen observat în special la temperatura de 85°C, timp de 4 și 9 minute (Figura 5.3), se presupune că migrarea metaboliților din celulele rupte în mediu, a contribuit la adaptarea la stres, sporind astfel rezistența celulelor încă vii.

Adecvarea modelului a fost evaluată prin coeficientul de determinare (R^2) și abaterea medie pătratică (AMP). Conform rezultatelor, modelul Weibull a oferit o descriere fidelă a inactivării microbiene pentru tratamentele testate. Astfel, AMP-ul de 0,20482 și R^2 mai mare de 0,9592 demonstrează o corelare bună pentru ambele modele experimentale.

Pornind de la estimările parametrilor de inactivare obținute prin modelul Mafart, s-a demonstrat inactivarea termică cu o reducere cu 5 log ufc/ml a celulelor. De asemenea s-a observat că timpul de inactivare real nu are o valoare fixă, aceasta variază în funcție de deviația standard a parametrilor modelați σ și p . În același timp, distribuția valorilor parametrilor σ și p este o distribuție normală de tip Gauss-Laplace.

Pentru simularea Monte Carlo s-au efectuat 5000 de iterații. Probabilitatea ca timpul de inactivare să fie ≤ 25 minute este de 31,38%, iar pentru un timp de ≤ 30 minute, probabilitatea este de 38,22%. Având în vedere rezultatul mai satisfăcător pentru probabilitatea de 38,22%, s-a ales timpul de 30 minute pentru inactivare.

În baza rezultatelor obținute și a modelării matematice a cineticii de inactivare a celulelor pentru obținerea paraprobioticelelor, se recomandă procesarea suspensiilor de celule în volum de 25 mL cu ultrasunete, la amplitudinea de 80%, timp de 20 minute, urmată de tratament termic, în volum de 3 mL, la temperatura de 75°C, timp de 30 minute. Pentru această variantă a fost propusă schema bloc pe operații unitare pentru obținerea paraprobioticelelor prin tratament combinat cu ultrasunete și tratament termic. Varianta optimizată a fost codificată Para80.

Rezultatele cineticii de inactivare a tulpinii codificate MIUG BL 80 demonstrează că, pentru tratamentul termic al suspensie de celule, anterior tratată cu ultrasunete, pe măsură ce temperatura crește, viteza de inactivare scade. Mecanismul de inactivare prin tratament cu ultrasunete provoacă leziuni ireversibile ale membranelor celulare bacteriene, generând pori care permit eliberarea metaboliților din celulă. Modificările legăturilor chimice și modificările structurii proteinelor cresc, de asemenea, permeabilitatea membranei. Aplicarea tratamentelor termice induce ruperea pereților celulari bacterieni, conducând la eliberarea de componente intracelulare, ADN-ul și constituenții peretelui celular (Kornienko, 2022).

5.3.2. Obținerea paraprobioticelelor prin tratament combinat, tratament termic și încălzire ohmică

În cazul, încălzirii ohmice se utilizează un curent electric alternativ pentru a genera căldură prin efectul Joule, ceea ce diferă de încălzirea convențională. Tratamentul ohmic poate provoca electroporarea, un efect non-termic, prin care câmpul electric extern creează un potențial transmembranar în membrana fosfolipidică. Acest potențial face ca compușii încărcăți negativ din interiorul microorganismelor să fie atrași de sarcina pozitivă externă și invers. Dacă tensiunea depășește limita membranei, se formează pori care conduc la liza membranei și moartea microorganismului (Müller et al., 2020). Celulele tratate prin încălzire ohmică au demonstrat o sensibilitate mai mare la tratamentul termic, comparativ cu tratamentul cu ultrasunete, când bacteriile lactice au fost mai rezistente la tratamentul termic. Astfel, pentru tulpina codificată MIUG BL 80 (Figura 5.5), la temperatura de 65°C s-a observat o reducere a viabilității de 2 log ufc/ml, după 3 minute, la temperatura de 75°C, după 2 minute, s-a obținut o reducere de 3,2 log ufc/ml, iar la temperatura de 85°C, după 1 minut, s-a detectat o reducere de 3,7 log ufc/ml. În acest caz, dinamica inactivării nu s-a validat statistic.

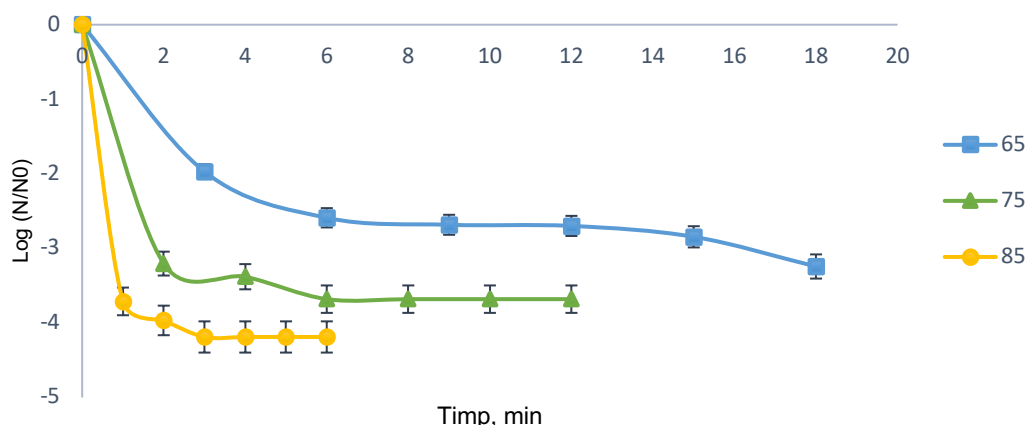


Figura 5.5. Dinamica inactivării termice a celulelor tulpinii MIUG BL 80, după tratamentul de încălzire ohmică

Celulele tulpinii codificată MIUG BL 87 după tratamentul ohmic ($4,63 \cdot 10^4$ ufc/mL) s-au inactivat în totalitate prin tratamentul termic, la toate cele trei temperaturi testate, chiar din primii timpi de inactivare. Nici în acest caz, rezultatele nu s-au validat statistic.

5.3.3. Efectul de citotoxicitate și capacitatea antitumorală a paraprobioticeelor

În cazul testelor realizate pe fibroblastele murine NCTC, clona L929, tratate cu Para80 și Para87, testul MTT a indicat un grad ridicat de biocompatibilitate, la diluțiile de 1/10 și 1/100, indiferent de durata expunerii. În ceea ce privește viabilitatea celulară în cazul tratamentului cu paraprobioticele Para80 nediluate, s-a observat o scădere până la valoarea de 72,36% pentru primele 24 de ore, pentru ca ulterior viabilitatea acestora să scadă semnificativ la 28,86%, după încă 24 de ore de tratament. Totodată, tratamentul aceleiași linii celulare cu proba Para87, nediluată a evidențiat o valoare a viabilității după 48 de ore, mai mare comparativ cu tratamentul realizat cu Para80, aceasta fiind de 43,76%.

Aceste rezultate demonstrează faptul că, prin co-cultivarea fibroblastelor murine cu ambele tipuri de paraprobiotice, diluate de 100 de ori, viabilitatea acestora nu scade sub 96 %, nici după 48 de ore de tratament.

În ceea ce privește tratamentul liniei celulare HT-29 cu paraprobioticele menționate, efectul antitumoral se observă doar în situația în care probele nu sunt diluate, viabilitatea acestora scăzând semnificativ și ajungând la 10,01% (pentru Para80) și respectiv la 10,70 % (pentru Para87), după 48 de ore de la co-incubare. Pentru celelalte concentrații testate, se constată efectul citotoxic doar în cazul diluției 1/2 , după 48 de ore de tratament, situație în care viabilitatea celulelor tumorale a scăzut la 65,69% (pentru Para80) și respectiv la 74,26%(pantru Para87).

În cazul evaluării integrității membranei fibroblastelor murine NCTC prin testul LDH, rezultatele obținute au fost în acord cu cele de viabilitate celulară realizate prin testul MTT. Mai exact, în urma tratamentului fibroblastelor cu probele Para80 și Para87, la concentrațiile aferente diluțiilor 1/10 și 1/100, după 48 de ore de incubare, cantitatea de LDH eliberată în mediul de cultură a fost comparabilă cu cea a probei control, demonstrându-se astfel o bună citocompatibilitate celulară a acestor paraprobiotice la concentrațiile menționate.

În schimb, tratamentul fibroblastelor murine cu paraprobioticele nediluate (concentrația 1) determină creșterea semnificativă a cantității de LDH eliberată, la 1,71 u.a., în cazul Para80

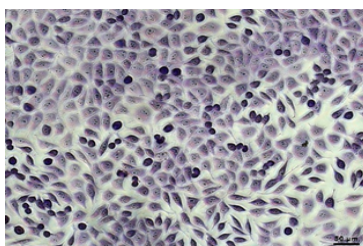
și 1,53 u.a, în cazul probei Para87, după 48 de ore de co-incubare. Concentrația aferentă diluției 1/2 afectează viabilitatea celulară mult mai puțin în primele 24 de ore, cantitatea de LDH eliberată fiind ușor crescută comparativ cu proba martor, însă aceasta crește în următoarele 24 de ore la 1,25 u.a. (pentru Para80) și 1,19 u.a. (pentru Para87).

În cazul evaluării integrității membranei celulelor tumorale incluse în linia celulară HT-29, prin testul LDH, tratamentul cu ambele probe aflate în concentrația aferentă diluției 1/2, determină un anumit nivel de afectare celulară care se accentuează semnificativ odată cu creșterea concentrației probelor și cu timpul de incubare. Mai exact, cantitatea de lactat dehidrogenază eliberată în mediul de cultură, a fost semnificativ mai mare în comparație cu proba control, ajungând la 1,80 u.a. pentru tratamentul cu Para80 și 1,83 u.a. pentru tratamentul cu Para87, după 48 de ore, ceea ce demonstrează inducerea efectelor citotoxice asociate efectului antitumoral.

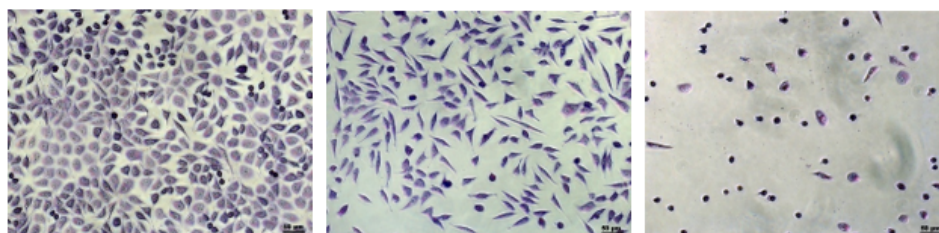
În schimb, pentru concentrațiile aferente diluțiilor 1/0 și 1/100, niciuna dintre probele evaluate nu au evidențiat efect antitumoral, după 24 de ore de tratament valorile LDH fiind comparabile cu cele existente în proba control.

Pentru a susține rezultatele menționate anterior, s-au realizat o serie de imagini de microscopie optica ale fibroblastelor murine NCTC cultivate atât în prezența probei Para 80 cât și a probei Para87. Astfel, se constată că, după 48 de ore de co-incubare, în cazul ambelor paraprobiotice, fibroblastele prezintă o morfologie celulară normală, similară cu cea a probei control, la concentrația corespunzătoare diluției 1/100. Celulele au prezentat un aspect normal, având o formă ușor poligonală, cu 2-3 prelungiri citoplasmatic, citoplasma fină și nuclei eucromatici cu nucleoli multipli. De asemenea, densitatea celulară a fost asemănătoare cu cea a probei control. În schimb, tratamentul fibroblastelor murine cu probele aflate la concentrația aferentă diluției 1/2, afectează densitatea celulară, aceasta scăzând vizibil, odată cu afectarea morfologiei celulare. Astfel, pe lângă celulele poligonale normale se observă și celule fusiforme sau celule stelate cu multiple prelungiri și citoplasmă granulară. Efectul citotoxic al paraprobiotice asupra liniei fibroblastice crește considerabil în situația în care probele sunt incubate fără nici o diluție, respectiv la concentrația 1, alături de scăderea semnificativă a densității celulare (Figura 5.6)

A



B



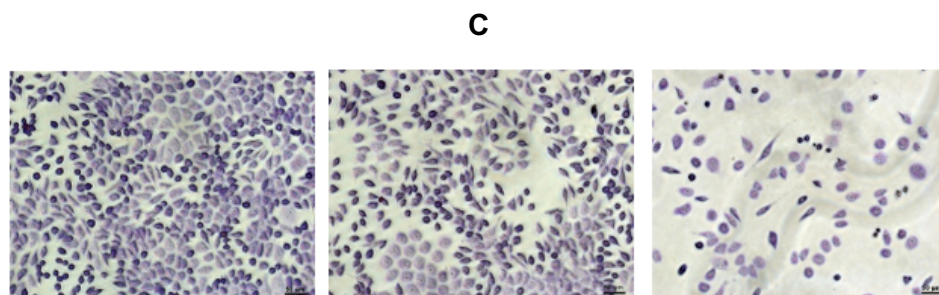
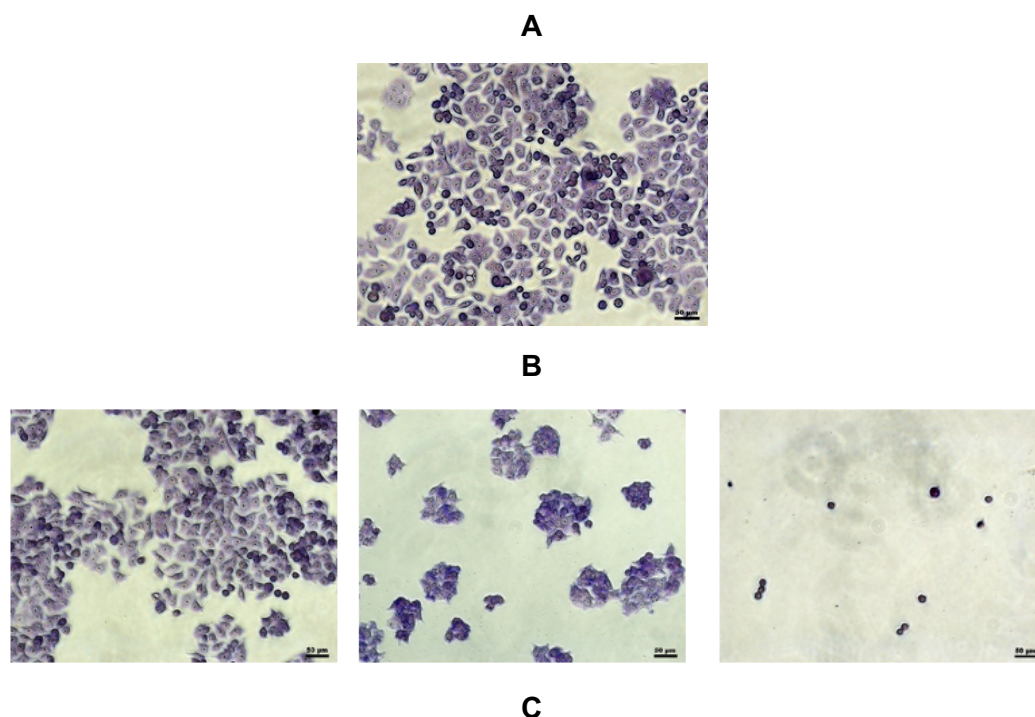


Figura 5.6. Imagini de microscopie ale fibroblastelor NCTC netratate (A) și tratate cu Para80 (B) și Para87 (C), la concentrațiile (de la stânga la dreapta) 1/100, 1/2, 1, după de 48 de ore de incubare

Pe de altă parte, imaginile oferite de microscopia optică, după incubarea celulelor intestinale tumorale HT-29 în prezența probelor Para80 și Para87, timp de 48 de ore, au dezvăluit o morfologie celulară epitelială normală, similară cu cea a probei control la concentrația aferentă diluției 1/100 (Figura 5.7). Totodată, densitatea celulară a fost similară cu cea a probei control. În schimb, tratamentul celulelor tumorale cu paraprobioticele aflate în concentrația aferentă diluției 1/2, nu determină modificări majore ale morfologiei celulare dar, afectează proliferarea celulară, care a fost inhibată. Astfel, densitatea celulară s-a redus semnificativ în comparație cu proba control.

În cazul tratamentului cu probele nediluate s-au observat modificări severe ale morfologiei celulare, celulele HT-29 fie au căpătat o formă rotundă, fie s-au detașat de substrat, în timpul procesului de colorare (Figura 5.7).



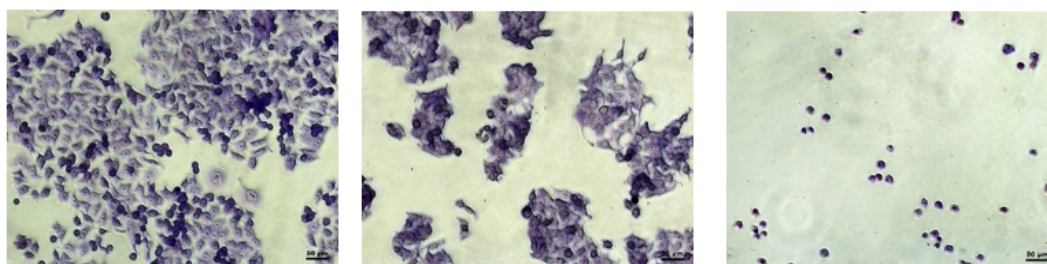


Figura 5.7. Imagini de microscopie ale celulelor tumorale HT-29 netratate (A) și tratate cu Para80 (B) și Para87 (C) la concentrațiile (de la stânga la dreapta) 1/100, 1/2, 1, după de 48 de ore de termostatare

Astfel, se poate aprecia faptul că, ambele tipuri de paraprobiotice au evidențiat cel mai ridicat grad de biocompatibilitate, în cazul concentrațiilor aferente diluțiilor 1/10 și 1/100, fiind citotoxice doar la concentrația maximă testată (forma nediluată). În ceea ce privește concentrația asociată diluției 1/2, proba Para80 manifestă efecte citotoxice asupra fibroblastelor murine doar după 48 de ore de tratament.

În ceea ce privește activitatea antitumorală, proba Para87 nu a evidențiat un astfel de efect la concentrațiile mai scăzute, însă începând cu diluția 1/2, a indus o scădere semnificativă a viabilității celulare, de 74,26%, ceea ce indică un potențial efect antitumoral.

Dacă ne raportăm la cea mai mică viabilitate celulară care să sugereze un efect antitumoral clar, fără a afecta în mod citotoxic celulele normale NCTC, atunci se poate aprecia că, în cazul probei Para87, concentrația aferentă diluției 1/2 ar putea fi relevantă.

Rezultatele indică faptul că citocompatibilitatea paraprobioticelelor este influențată de metoda de inactivare aleasă și de diluția acestora. De asemenea, efectele benefice pentru sănătate, precum proprietățile imunomodulatoare, capacitatea de a regla microbiota intestinală și impactul asupra translocării bacteriene depind de tratamentul de inactivare ce păstrează componentele celulare esențiale, cum ar fi acidul teichoic, acidul lipoteichoic, peptidoglicanul, forma suprafeței celulare și structura generală a celulei. De asemenea, o explicație pentru efectele antioxidante, antiinflamatoare și de restaurare a integrității intestinale ale paraprobioticelelor comparativ cu probioticele este aceea că anumiți compuși bioactivi, inclusiv fosfolipide, acizi grași, oligozaharide și compuși asemănători peptidoglicanului, sunt eliberați din structurile interne și membranele celulare ale bacteriilor neviabile, menținându-se într-o formă activată (Kang et al., 2025).

5.4. Concluzii parțiale

Rezultatele obținute prin tratamentele suspensiei de celule ale culturilor de bacterii lactice cu potențial probiotic și modelarea matematică a cineticii de inactivare a demonstrat că, în condițiile testate, inactivarea în totalitate a celulelor se obține prin tratamentul unui volum de 25 mL de suspensie celulară ($1 \cdot 10^8$ ufc/mL), utilizând ultrasunete la o intensitate de 80%, timp de 20 de minute, urmat de tratament termic la temperatura de 75°C, timp de 30 minute.

Tratamentul preliminar cu ultrasunete sau prin încălzire ohmică generează diferențe semnificative în ceea ce privește efectele asupra integrității celulei bacteriene și a compușilor eliberați prin ruperea celulelor. În cazul tratamentului cu ultrasunete, celula bacteriană este adesea fragmentată complet, ceea ce conduce la eliberarea unui spectru larg de compuși

intracelulari bioactivi. În contrast, încălzirea ohmică menține în mare parte integritatea celulei. Astfel, ultrasunetele sunt preferabile când se dorește obținerea de fragmente celulare și metaboliți specifici, iar tratamentul ohmic este util pentru păstrarea structurilor celulare intacte, dar inactivate.

Ambele tratamente oferă soluții complementare pentru obținerea paraprobioticeleor, a căror eficiență funcțională va fi demonstrată prin aplicațiile practice vizate ulterior. Mai mult, rezultatele demonstrează că paraprobioticele pot fi sigure la diluție de 1/10 și 1/100 și citotoxice doar în forma nediluată.

Paraprobioticul Para80 a prezentat efecte citotoxice moderate la o diluție de $\frac{1}{2}$, după 48 h, iar paraprobioticul Para87 a demonstrat un posibil efect antitumoral semnificativ la diluția 1/2, fără a afecta celulele normale.

Capitolul 6. Valorificarea potențialului biotic al postbioticelor și paraprobioticeleor

6.1. Obținerea și utilizarea unui ingredient cu potențial biotic pentru formularea furajelor cu aplicații în acvacultură

6.1.1. Introducere

În industria alimentară, postbioticcele joacă un rol esențial în susținerea siguranței alimentare, prin inhibarea agenților patogeni, asigurarea inocuității și prelungirea termenului de valabilitate al produselor. În plus, acestea sunt adăugate în alimente funcționale și suplimente nutritive pentru a oferi beneficii adiționale pentru sănătatea consumatorilor, evitând necesitatea manipulării culturilor vii, care sunt sensibile la condițiile de depozitare și procesare (Colombo Pimentel et al., 2024). Compuși ca bacteriocinele, acizii organici, enzimele sunt utilizați pentru a asigura bioconservarea și ambalarea alimentelor, controlul formării biofilmelor și biodegradarea contaminanților, contribuind astfel la îmbunătățirea calității, a inocuității și a siguranței produselor alimentare (Moradi et al., 2020).

În industria piscicolă, postbioticcele sunt utilizate pentru a îmbunătăți sănătatea și productivitatea peștilor, crescând rezistența la boli, îmbunătățind absorbția nutrienților și optimizând creșterea, fără riscul de contaminare a mediului acvatic (Wu et al., 2020). Postbioticcele care pot fi încorporate în hrana peștilor pot fi vitaminele B, K și aminoacizi aromatici, acizi grași cu lanț scurt (acidul acetic, acidul propionic și acidul butiric), peptide antimicrobiene (bacteriocinele și defensinele), glutationul, acidul fenilactic și aminoacizii. De asemenea, în categoria postbioticelor au fost incluse și peroxidul de hidrogen, compușii organici volatili (VOCs) și fitoestrogeni (equolul, enterolactona și enterodiolul), urează A și B, acidul hidroxifenilacetic și exopolizaharidele (EPS) (Tao et al., 2024). Folosirea acestor ingrediente în furajarea peștilor asigură creșterea calității vieții în mediul acvatic, obținerea produselor acvatice de calitate superioară și mai sigure pentru consumul uman.

Scopul principal al studiului prezentat în acest subcapitol a fost evaluarea proprietăților bioactive ale produsului fermentat obținut prin co-cultivarea consorțiilor artisanale de microorganisme din microbiota membranelor de kombucha și din GCL, prin evaluarea impactului acestuia asupra dezvoltării și sănătății peștilor, crescuți în sistem recirculant.

6.1.2. Materiale și metode

Metodele experimentale au vizat:

- Integrarea produsului fermentat optimizat NutriFerment (din subcapitolul 4.1.2) în formularea furajelor pentru dieta peștilor din specia *Acipenser baerii* (sturion siberian)
- Evaluarea impactului fiziologic al furajelor suplimentate cu NutriFerment cu potențial biotic

6.1.3. Rezultate și discuții

Caracteristicile produsului fermentat utilizat ca ingredient în furaje

Produsul fermentat analizat în subcapitolul 4.1.2 prezintă caracteristici bioactive precum aciditate titrabilă de 456,25°Th, activitate antioxidantă- 2,42 mM ET/ml, activitate antibacteriană împotriva *E. coli* (8,67 mm), *S. aureus* (8,00 mm) și *B. Subtilis* (21,67 mm). De asemenea, produsul fermentat în forma sa liofilizată, conține postbiotice cu proprietăți funcționale, cum ar fi acizi organici (citric - 18,38 mg/ml, butiric - 104,14 mg/mL și izovaleric - 6,03 g/ml) și compuși fenolici (acizi galici și cafeici -170,36 și 21,56 μg/ml, epicatechină - 9946,63 μg/ml, isorhamnetină- 4,20 μg/ml, hesperidină - 456,05 μg/ml, quercetină 3-β-D-glucozidă - 18,42 μg/ml). Aceștia pot contribui la menținerea sănătății gastrointestinale, modularea sistemului imunitar și reducerea inflamației (Pihurov et al., 2022).

Compușii detectați în produsul obținut certifică impactul pozitiv asupra proprietăților funcționale ale produsului, prin conținutul de acizi organici și compuși fenolici, precum și proprietățile antimicrobiene și antioxidante. Produsul obținut este recomandat ca un bioingredient valoros, cu mai multe aplicații posibile în formularea alimentelor și furajelor, cu impact *in vitro* (stabilitatea și calitatea furajelor) și *in vivo* (sănătatea și calitatea vieții organismelor).

Evaluarea efectului postbioticelor asupra creșterii și funcțiilor metabolice ale peștilor

Rezultatele obținute (Tabelul 6.1), certifică că pentru varianta de furajare codificată PK2, ce conține 0,2% NF, au subliniat că peștii din acest lot au prezentat cea mai bună performanță de creștere în ceea ce privește acumularea de biomasă și eficiența conversiei furajelor. Astfel, după 35 de zile de creștere, greutatea totală a crescut de 1,84 ori, greutatea medie a crescut de 1,84. Iar, raportul de conversie a furajului a fost de 1,19, iar rata specifică de creștere a fost de 1,21. Raportul de eficiență a proteinelor a avut valoarea de 1,55, iar procentajul de creștere în greutate a fost de 83,93% (Rimniceanu et al., 2022).

Tabelul 6.1. Parametrii de creștere a sturionilor hrăniți cu furaj suplimentat cu postbiotice

Parametrii	Variante experimentale			
	PM	PK1	PK2	PK3
Sporul de creștere (g)	204,94 ± 11,40 ^a	209,44 ± 17,84 ^a	220,32 ± 28,16 ^a	204,03 ± 5,78 ^a
Factorul de conversie al hranei (kg furaj/kg spor creștere)	1,28 ± 0,05 ^a	1,26 ± 0,11 ^a	1,19 ± 0,15 ^a	1,29 ± 0,04 ^a
Rata specifică de creștere (%/zi)	1,15 ± 0,06 ^a	1,16 ± 0,07 ^a	1,21 ± 0,16 ^a	1,14 ± 0,03 ^a
Coeficientul de eficiență proteică	1,44 ± 0,03 ^a	1,47 ± 0,13 ^a	1,55 ± 0,20 ^a	1,44 ± 0,04 ^a

Procentajul de creștere în greutate (%)	77,94 ± 5,46 ^a	79,13 ± 6,41 ^a	83,93 ± 5,24 ^a	77,09 ± 6,12 ^a
---	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------

Deși nu au fost identificate diferențe statistice semnificative, rezultatele oferă informații importante despre stabilitatea și consistența experimentului. Aceste rezultate contribuie la o înțelegere mai clară și sugerează direcții pentru cercetări suplimentare, precum ajustarea condițiilor experimentale, a parametrilor testați sau explorarea altor factori care nu au fost considerați în prezentul studiu, dar care ar putea fi relevanți.

Stresul oxidativ a fost evaluat prin determinarea nivelurilor de malondialdehidă (MDA) și glutathion redus (GSH), acesta a fost diminuat pentru toate variantele experimentale, cu excepția variantei martor. Astfel, GSH a înregistrat cea mai mare valoare pentru lotul furajat cu varianta PK3, cu valoarea de $0,29 \pm 0,09 \mu\text{Mol/dl}$, mai mare comparativ cu lotul furajat cu varianta PK1 unde concentrația a fost de $0,22 \pm 0,07 \mu\text{Mol/dl}$. În cazul lotului furajat cu varianta PK2 concentrația GSH ($0,28 \pm 0,014 \mu\text{Mol/dl}$) nu a fost diferită față de lotul furajat cu varianta PK3 ambele fiind însă diferite de varianta martor, unde, la finalul experimentului, valoare GSH a fost doar $0,18 \pm 0,05 \mu\text{Mol/dl}$. Valorile MDA au urmărit îndeaproape tendința GSH evidențiindu-se astfel faptul că suplimentarea furajelor pentru sturioni cu 0,2% NutriFerment stimulează sistemul oxidativ prin producerea de molecule de glutathion și reducerea MDA (Rimniceanu et al., 2023).

6.1.4. Concluzii parțiale

Produsele fermentate cu consorții de microorganisme (bacterii și drojdii) simbiotice, asociate în GCL și membrane SCOBY, sunt promițătoare pentru utilizare în acvacultură ca aditivi furajeri ecologici. Studiul preliminar sugerează că produsele fermentate cu aceste culturi artisanale, pe bază de ceai negru, colostru și zahăr, conțin acizi organici (citric, acetic, izovaleric, galic și cafeic), precum și alți compuși bioactivi, cum ar fi epicatechina, miricetina, isorhamnetina, hesperidina și quercetina, care pot îmbunătăți apărarea antioxidantă a sturionilor, pot stimula maturarea și pot crește eficiența hrănitoare. Noua abordare a conceptului de metabiotice, prin dezvoltarea conceptului clasic de probiotice, oferă perspective inovatoare pentru dezvoltarea de noi produse și ingrediente cu impact în creșterea calității vieții.

6. 2. Testarea proprietăților bioactive ale paraprobioticelelor utilizând drojdia *Saccharomyces cerevisiae* ca organism model

6.2.1. Introducere

Paraprobioticele au atras atenția pentru rolul lor în menținerea echilibrului microbiomului intestinal, în special în interacțiunea cu drojdiile. Acestea pot preveni infecțiile oportuniste cauzate de drojdii, cum ar fi cele produse de *Candida albicans*, prin mai multe mecanisme: inhibarea creșterii drojdiilor și perturbarea metabolismului lor, modularea răspunsului imunitar pentru a stimula apărarea împotriva infecțiilor fungice, îmbunătățirea barierei intestinale, pentru a preveni translocarea drojdiilor în sânge sau alte organe, reducerea inflamației, pentru a preveni deteriorarea țesuturilor și complicațiile asociate infecțiilor fungice (Siciliano et al., 2021; Vazquez-Munoz & Dongari-Bagtzoglou, 2021). Aceste efecte le fac candidate valoroase pentru utilizarea în produsele alimentare și suplimentele menite să susțină sănătatea intestinală și imunitară.

Microorganismele sunt utilizate pentru a studia diferite aspecte ale stresului oxidativ la nivel biochimic, molecular și celular, oferind modele utile. Deteriorarea oxidativă a proteinelor, lipidelor, acizilor nucleici și a altor componente celulare, precum și sistemele de apărare împotriva stresului oxidativ (García-Sánchez et al., 2020). Modelul preferat pentru studierea răspunsului la stres în celulele eucariote este drojdia *Saccharomyces cerevisiae* (Vanderwaeren et al., 2022).

Pentru drojdia de panificație, *Saccharomyces cerevisiae*, s-a demonstrat că paraprobioticele stimulează creșterea drojdiei și producția de CO₂, îmbunătățind textura și volumul aluatului. De asemenea, contribuie la fermentarea constantă prin creșterea rezistenței drojdiei la condiții nefavorabile și contaminare. Aceste interacțiuni optimizează procesul de fermentare și calitatea produselor finale în produse de patiserie (Dangi et al., 2017) .

Obiectivul principal al acestui studiu a vizat evaluarea eficacității paraprobioticelelor obținute din tulpina bacterii lactice a tulpinii *Lactocaseibacillus paracasei* MIUG BL 80 prin tratamente combinate ultrasunete-termic utilizând tulpina de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* ca celule model.

6.2.2. Materiale și metode

Studiul a vizat:

- Evaluarea comportamentului metabolic al drojdiei în medii suplimentate cu paraprobiotice cu ajutorul modelării cinetice prin modelul Gompertz;
- Evaluarea stabilității drojdiei în timpul depozitării în prezența paraprobioticelelor
- Evaluarea capacității fermentative a drojdiei în prezența paraprobioticelelor

6.2.3. Rezultate și discuții

Analiza dinamicii și cinetica multiplicării celulelor de drojdie

Modelul Gompertz este printre cele mai frecvent utilizate modele sigmoide pentru analiza datelor de creștere și multiplicare a culturilor de microorganisme. Modelul Gompertz poate fi aplicat pentru a descrie creșterea plantelor, a diferitelor specii de animale, precum și a microorganismelor, inclusiv a bacteriilor (Tjørve & Tjørve, 2017). Reparametrizarea ecuației Gompertz a fost introdusă pentru a transforma parametrii săi matematici în parametri biologici semnificativi, rezultând modelul Gompertz modificat de Zwietering. Acest model este utilizat în principal pentru analiza datelor de evoluție a culturilor de bacterii în timpul cultivării în medii lichide (Gomes et al., 2021). În acest studiu, modelul a fost folosit pentru evaluarea evoluției culturii de drojdie testate. Iar drojdia *Saccharomyces cerevisiae* este folosită ca organism model pentru studiile ce vizează evaluarea răspunsului celular la diferite tipuri de stres (Kwolek-Mirek & Zadrag-Tecza, 2014).

Conform modelului Gompertz, evoluția culturii este dependentă în special de parametrul A, care este în creștere la probele suplimentate cu paraprobiotice, comparativ cu proba martor.

Într-un model ideal, R² trebuie să aibă o valoare apropiată de 1, indicând o reproductibilitate sportită a datelor experimentale. În contextul experimentului realizat (Tabelul 6.2), valorile R² observate (între 0,538 și 0,752) sunt moderate, sugerând că modelul explică variabilitatea procesului de fermentație. Deși nu sunt ideale, aceste valori sunt rezonabile pentru un sistem complex.

Tabelul 6.2. Parametrii de multiplicare a celulelor de drojdie, în acord cu modelul Gompertz

Parametrii	M	P5	P10	P15
A	1,334±0,320	1,461±0,273	1,505±0,243	1,586±0,235
($\mu_{\max} \times e$)/A	195,800±5,803	196,300±4,922	196,500±4,374	196,800±4,247
λ	-0,010			
R ²	0,538	0,657	0,720	0,752
AMP	0,422			

Pentru un model ideal, abaterea medie pătratică (AMP) ar trebui să fie cât mai aproape de 0, ceea ce ar semnala o potrivire perfectă între valorile estimate și cele reale. Parametrul AMP exprimă eroarea medie dintre valorile observate și cele prezise de model. Totuși, în condiții reale, mai ales în procese dinamice precum fermentația, un AMP cu valoarea 0 este puțin probabil de obținut. Valoarea AMP de 0,422 sugerează o potrivire rezonabilă a modelului. În procesul de fermentație, factori precum temperatura, pH-ul și activitatea microbiană sunt variabile independente.

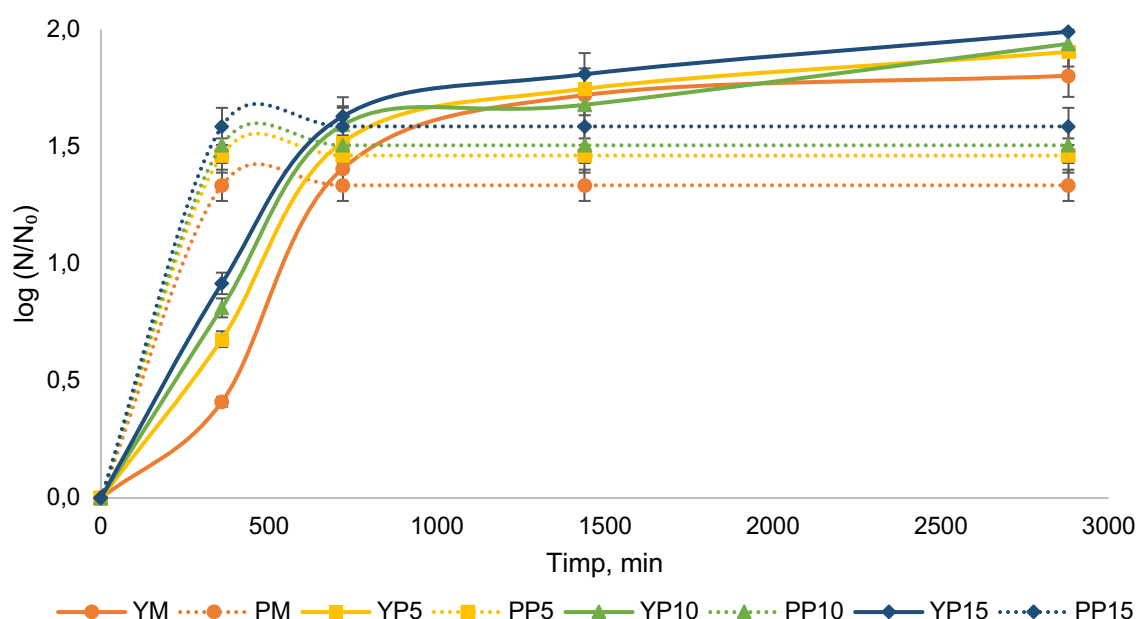


Figura 6.2. Dinamica culturii de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* conform modelului Gompertz (literele din fața numelui probei indică tipul datelor: "Y" reprezintă valorile experimentale, iar "P" valorile prezise)

Efectul paraprobiotice asupra dinamicii de înmulțire a drojdiei de panificație în prezența paraprobiotice este descrisă în Figura 6.2. În toate probele, faza exponențială este mai accentuată în primele 6 h. Probele au prezentat rezultate apropiate în stimularea multiplicării celulelor, indicând ușoare diferențe între ele. Astfel, în primele 6 ore de cultivare, la o concentrație de peste 10% de paraprobiotic, numărul de generații aproape se dublează comparativ cu martorul. Aceeași tendință se observă și în cazul vitezei de înmulțire, în timp ce timpul de generație se reduce aproximativ la jumătate.

Randamentul biomasei uscate determinat după 48 de ore de cultivare are valori mai mari la proba martor (5,078 g/L) și proba P10 (4,955 g/L), urmând proba P5 (4,780 g/L) și P15 (4,527 g/L). Această diferență de biomasă sugerează o încetinire a creșterii după perioada de multiplicare exponențială sau creșterea concentrației de paraprobiotice duce la scăderea randamentului în biomasa uscată, posibil din cauza accelerării diviziunii celulare și formării de celule mai mici și mai puțin dense metabolic. Acest efect este util în aplicații care necesită un număr mare de celule, cum ar fi probioticele, fermentațiile rapide și cercetările fundamentale. Totuși, sunt necesare studii suplimentare pentru confirmarea acestor ipoteze.

Parametrii cinetici ai înmulțirii drojdiilor, după 6h de cultivare (faza exponențială) sunt prezentați în Tabelul 6.3. Datele experimentale obținute demonstrează un efect pozitiv al paraprobioticelelor asupra cineticii de înmulțire a drojdiilor, cel mai bun efect obținându-se pentru cea mai mare concentrație testată de paraprobiotic, 10%.

Tabelul 6.3. Parametrii cinetici de multiplicare a celulelor de drojdie în faza exponențială (6h)

Proba	Numărul de generații (n)	Viteza de înmulțire (v), 1/h	Timpul de generație (t _g), h
M	1,363 ± 0,101 ^b	0,227 ± 0,060 ^b	4,403 ± 0,474 ^a
P5	2,252 ± 0,320 ^{ab}	0,375 ± 0,101 ^{ab}	2,665 ± 0,653 ^b
P10	2,695 ± 0,379 ^a	0,449 ± 0,014 ^a	2,226 ± 0,133 ^b
P15	3,042 ± 0,536 ^a	0,507 ± 0,094 ^a	1,972 ± 0,081 ^b

*Literale diferite din coloană indică diferențe semnificative pentru $p < 0,05$.

După 6 h de cultivare, în faza exponențială de înmulțire, se observă că numărul de generații crește de la 1,363, pentru proba M, la 3,042, pentru proba P15, ce indică o multiplicare celulară mai mare în probele cu adaos de paraprobiotice, în comparație cu martorul. Viteza de înmulțire urmează aceeași tendință ascendentă, crescând de la 0,227 h⁻¹, pentru proba M, până la 0,507 h⁻¹, pentru proba P15. Timpul de generație, care reprezintă timpul necesar pentru ca populația de celule să se dubleze, scade semnificativ de la 4,403 h, pentru proba M, și mult mai rapid de 1,972 h, pentru proba P15. Datele experimentale arată că paraprobioticele influențează pozitiv cinetica multiplicării drojdiilor, în special la concentrații mai mari de 10%. Modelul pentru numărul de generații prezintă un coeficient de determinare (R²) de 0,814 și o valoare p de 0,003; modelul pentru rata de multiplicare are un R² de 0,743 și o valoare p de 0,010; iar în cazul timpului de generație, modelul obținut are un R² de 0,889 și o valoare p de 0,000.

Un studiu specifică că cinetica de creștere a drojdiei *S. cerevisiae* urmează un tipar bine definit: o fază de latență de 0–4 ore, urmată de o fază exponențială între 4 și 12 ore, iar apoi o fază de declin după 12–16 ore. În aceste intervale de timp, rata de creștere a variat între 0,344 și 0,367 h⁻¹, cu o valoare maximă de 0,380 h⁻¹ (Saygili et al., 2023). Mai multe modele matematice au fost aplicate pentru a descrie acest proces de creștere în timpul fermentației, arătând o potrivire bună cu datele experimentale (abaterea medie pătratică între 0,1103 și 0,5721 și R² între 0,81 și 0,97). Rata specifică maximă de creștere ($\mu_{\max}$) s-a situat între 0,377 și 0,593 h⁻¹, iar semne vizibile de dezvoltare au apărut la aproximativ 3 ore după inoculare. Greutatea celulară uscată maximă a fost atinsă în jurul a 23 de ore, după care drojdia a intrat în faza staționară (24–27 h) și ulterior în faza de declin, fără modificări evidente la nivel vizual (Ardestani, 2014).

Evaluarea activității fermentative a drojdiei în prezența paraprobioticeleor

Pentru evaluarea activității fermentative a drojdiei crescute în mediul cu adaos de probiotice, s-a folosit metoda Ostrovski prin determinarea timpului de ridicare a bilei de aluat la suprafață (Tabelul 6.4).

Tabelul 6.4. Evaluarea activității fermentative a drojdiei prin metoda Ostrovski

	M	P5	P10	P15
Timpul de ridicare, min	14,45±0,104 ^{a*}	14,20±0,153 ^a	13,41±0,108 ^b	13,26±0,168 ^b

*Literale diferite arată diferențe semnificative pentru $p < 0,05$

Datele experimentale indică de asemenea o activare a capacității fermentative a drojdiei testate prin creșterea concentrației de paraprobiotic. Din datele prezentate se observă o diferență semnificativă între proba martor M și probele P10 și P15, ceea ce sugerează că o cantitate mai mare de 10% suspensie de Para80 în mediul de fermentare influențează pozitiv activitatea fermentativă a drojdiei.

Efectul paraprobioticeleor asupra viabilității celulelor la depozitare

Determinarea viabilității celulare este o metodă importantă în analiza citotoxicității și genotoxicității, având și aplicații în procesele industriale care implică microorganisme. Viabilitatea celulară este exprimată ca procentajul de celule vii dintr-o populație (Kwolek-Mirek & Zadrag-Tecza, 2014).

Stabilitatea metabolică a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* în prezența Para80 s-a exprimat prin procentul de celule viabile după 48 de ore, 7 zile și 14 zile de păstrare la temperatura de 4°C. Celula drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* conține aproximativ 70-72% apă, 42-45% proteine, 40% carbohidrați, 7,5% lipide (în substanță uscată) și vitamine din complexul B. Analiza celulelor de drojdie indică faptul că aceasta reprezintă un sistem biologic complex, care suferă modificări în timp, iar intensitatea acestor schimbări depinde de condițiile de păstrare, temperatura fiind un parametru important. O probă de drojdie a fost păstrată la temperatura 4°C, timp de 12 zile, iar în această perioadă, conținutul de carbohidrați totali a scăzut de la 48,81% la 37,50% (pe bază de substanță uscată). De asemenea, conținutul de trehaloză a fost de 12,33% (Pejin et al., 2009).

Tabelul 6.5. Stabilitatea celulelor de drojdie prin conservare la temperatura de 4°C

Proba	Celule viabile, %		
	48 h	7 zile	14 zile
M	90,74±0,63 ^{a*}	89,44±0,51 ^a	88,24±0,44 ^a
P5	93,11±0,39 ^b	92,68±1,25 ^b	91,57±0,83 ^b
P10	94,48±0,60 ^c	94,18±0,80 ^c	94,15±0,64 ^c
P15	95,57±0,74 ^d	95,39±0,76 ^d	95,45±1,25 ^d

*Literale mici diferite într-o coloană denotă diferențe semnificative între proba martor și probele P ($p < 0,05$)

Rezultatele obținute (Tabelul 6.5) demonstrează efectul pozitiv al paraprobioticului testat Para80 asupra viabilității celulelor de drojdie, în perioada de 48 ore până la 14 zile de păstrare a biomasei umede, la temperatura de 4°C. Un studiu a evaluat viabilitatea celulelor de drojdie menținute la temperaturi cuprinse între -20°C și 30°C, în medii lichide cu adaos de lactoză, amidon și trehaloză. După 4 săptămâni de termostatare, la temperaturile 4°C și 10°C,

pentru o tulpină de *Pichia anomala*, 75-90% dintre celule au rămas viabile, fără diferențe semnificative de stabilitate celulară în funcție de compusul adăugat ca stabilizator (Melin et al., 2006).

6.2.4. Concluzii parțiale

Paraprobioticul testat (Para80), conținând celule bacteriene inactivate, întregi sau fragmente de celule ale tulpinii probiotice *Lactocaseibacillus paracasei* MIUG BL 80 a demonstrat că exercită efecte pozitive asupra comportamentului metabolic al drojdiei de panificație, prin suplimentare în mediile fermentative în concentrații de peste 10%. De asemenea, în prezența paraprobioticului Para80 procesul de autoliză al celulelor de drojdie a fost încetinit, prin păstrare la temperatura de 4°C, timp de 14 zile, au prezentat stabilitate față de autoliză. Aceste rezultate creează premise pentru noi aplicații practice ale paraprobioticelor în creșterea funcționalității culturilor starter și a diversității produselor și a ingredientelor funcționale.

6. 3. Valorificarea paraprobioticelor pentru obținerea unei băuturi fermentate, cu potențial funcțional, pe bază de maia din făină de secară și zaț de cafea

6.3.1. Introducere

Produsele fermentate au fost apreciate de-a lungul timpului nu doar pentru gustul și textura lor unică, ci și pentru beneficiile aduse sănătății. Recent, odată cu avansarea cercetărilor în domeniul microbiomului, un nou tip de produse fermentate a câștigat atenție: băuturile îmbogățite cu paraprobiotice (Zahidah et al., 2024). Aceste băuturi reprezintă o inovație ce combină tradițiile fermentative cu avantajele moderne ale biotehnologiei. Băuturile fermentate cu paraprobiotice sunt produse care conțin microorganisme inactivate (moarte) sau fragmente de celule bacteriene, cu proprietăți bioactive, până în prezent puțin elucidate. Spre deosebire de probioticele tradiționale, care trebuie să fie vii pentru a fi eficiente, paraprobioticele nu necesită această condiție, ceea ce le face mai stabile și mai rezistente la condiții de depozitare și procesare. Astfel, paraprobioticele sunt mai stabile decât probioticele vii, ceea ce înseamnă că produsele funcționale care le conțin au o stabilitate sporită din acest punct de vedere.

Studiul prezentat în acest subcapitol a vizat dezvoltarea unei rețete inovative de cvas prin înlocuirea substratului tradițional de pâine uscată cu maia obținută din făină integrală de secară și valorificarea zațului de cafea, și fermentare cu drojdia *Saccharomyces cerevisiae*, pentru obținerea unei băuturi funcționale cu caracteristici nutriționale și funcționale îmbunătățite. S-a urmărit, de asemenea, și evaluarea potențialului bioactiv al paraprobioticelor (Para80) în sinergie cu microorganismele și substraturile utilizate.

6.3.2. Materiale și metode

Metodele au vizat:

- integrarea paraprobioticelor în băutură fermentată
- analiza proprietăților bioactive ale băuturii fermentate
- Analiza compușilor polifenolici din băutura fermentată
- Analiza senzorială a băuturii obținute, prin scala hedonică cu 5 puncte, prin care s-au evaluat caracteristici precum culoare, limpiditate, gust, carbonatare, aftertaste, textură, acceptabilitate și aprecierea generală.

Produsul finit, marcat cu codul P₂ a fost denumit MetaKvas.

6.3.3. Rezultate și discuții

Proprietățile bioactive ale băuturii fermentate

Datele experimentale (Tabelul 6.6) arată că valorile pH-ului au variat între 3,35 și 3,52, ceea ce indică faptul că toate probele sunt acide. Lidmus și colab., 2016, au fost determinat în probele de cvas (un produs fermentat obținut în condiții similare) substanța uscată de 8,6 % și pH-ul de 3,88 pentru cvasul fermentat cu *S. cerevisiae*, respectiv 7,0 % și 4,60 pentru cvasul fermentat cu *Kluyveromyces marxianus* (Lidums et al., 2016). Iar, aciditatea totală titrabilă a variat între 12,78 și 14,59 mL NaOH 0,1 N, fiind mai mare pentru probele codificate M₂ și P₂. Activitatea antioxidantă a prezentat valori cu variații între 2,299 și 2,351 μM ET/mL, cu o valoare mai ridicată pentru proba codificată M₂, urmată de probele codificate M₁, P₂ și P₁. Kaszuba și colab., 2024, pentru activitatea antioxidantă determinată prin metoda cu DPPH au obținut valorile de 1,83 μmol Trolox/g, pentru proba martor (cvas simplu) și de 2,11 μmol Trolox/g, pentru probele suplimentate cu extracte din plante (Kaszuba et al., 2024).

Tabelul 6.6. Evaluarea caracteristicilor bioactive ale probelor de băuturi fermentate

Prob.	pH	Aciditatea totală titrabilă, mL NaOH 0,1 N	Activitatea antioxidantă, mM ET/ mL	Activitatea antibacteriană asupra <i>B. subtilis</i> , mm	Activitatea antibacteriană asupra <i>S. aureus</i> , mm	Activitate antifungică asupra <i>A. niger</i> , %
M ₁	3,38±0,02 ^{a*}	14,48±0,07 ^a	2,316±0,03 ^a	11,6±0,24 ^a	6,66±0,11 ^a	74,71±1,12 ^b
P ₁	3,35±0,02 ^a	12,78±0,05 ^a	2,299±0,06 ^a	12,00±0,15 ^b	7,83±0,16 ^b	71,48±2,04 ^b
M ₂	3,52±0,01 ^b	14,59±0,08 ^b	2,351±0,02 ^a	14,5±0,21 ^b	9,66±0,13 ^c	85,75±1,44 ^a
P ₂	3,48±0,02 ^b	13,48±0,02 ^c	2,300±0,02 ^a	12,00±0,30 ^b	10,33±0,15 ^d	86,41±1,59 ^a

*Datele prezentate sunt media ± abaterea standard (SD). Literale diferite dintr-o coloană reprezintă diferențe semnificative conform testului Tukey $p < 0,05$

Analiza ANOVA și testul Tukey au fost efectuate pentru analiza varianței și s-a observat că valoarea p ($p \leq 0,05$) și coeficientul de regresie, R^2 pentru pH ($R^2=95,74\%$), aciditatea totală titrabilă ($R^2= 99,47\%$), activitatea antibacteriană împotriva *S. aureus* ($R^2=97,38$), activitatea antibacteriană împotriva *B. subtilis* ($R^2=99,40$) și activitatea antifungică împotriva *A. niger* ($R^2=96,32$), confirmă validitatea statistică a datelor ce descriu caracteristicile funcționale ale produsului fermentat. Doar datele obținute pentru activitatea antioxidantă nu semnificative statistic ($p \geq 0,05$ și $R^2=37,90\%$).

Zonele de inhibiție pentru activitatea antibacteriană împotriva bacteriei *B. subtilis* a variat între 11,6 și 14,5 mm. Iar, activitatea antibacteriană asupra bacteriei *S. aureus* a variat între 6,66 și 10,33 mm. Proba codificată P₂ a prezentat cea mai pronunțată activitate antibacteriană (10,33 mm), în timp ce proba codificată M₁ a avut cel mai scăzut potențial antibacterian (6,66 mm). Această variație a activității antimicrobiene sugerează că anumiți compuși postbiotici formați prin fermentare în probele codificate P au o eficacitate mai mare împotriva speciei *S. aureus*. Activitatea antifungică asupra mucegaiului *A. niger* (%) a variat între 74,71% și 86,41%, Proba codificată P₂ a prezentat cea mai ridicată activitate antifungică

(86,41%), ceea ce indică o eficiență crescută împotriva mucegaiului *A. niger*. Probele codificate M₂ și P₂ au prezentat potențial antifungic superior comparativ cu probele codificate M₁ și P₁. Proprietățile antimicrobiene sunt în corelație cu potențialul tulpinilor fermentative de a produce metaboliți cu activitate antimicrobiană prin metabolizarea substraturilor fermentative.

Conținutul de compuși polifenolici

Tabelul 6.7 prezintă nivelurile (exprimate în µg/mL) ale unor compuși bioactivi identificați în mostrele de băutură fermentată fără paraprobiotic M₂ și cu paraprobiotic P₂, obținute dintr-un amestec de maia de secară integrală, zaț de cafea, drojdie, paraprobiotic și zahăr. În compoziția băuturii fermentate se regăsesc acizi fenolici (precum acidul 4-hidroxibenzoic, galic, syringic, vanilic și protocatechuic), terpenoidul cafestol, alcaloidul cofeină, precum și flavonoidul epicatechină. Deși unii compuși au fost identificați, cantitățile lor nu au putut fi determinate cu precizie din cauza faptului că valorile se aflau sub limita de cuantificare (LOQ) a metodei aplicate (Știmac et al., 2022).

Tabelul 6. 7. Compoziția băuturii fermentate în conținut de compuși polifenolici

Compus fenolic	Concentrație, µg/mL	
	M ₂	P ₂
Acid galic	105,51 ± 0,76 ^a	102,72 ± 0,31 ^a
Acid syringic	8,87 ± 0,63 ^a	ND
Acid protocatechuic	33,86 ± 1,61 ^a	34,48 ± 0,14 ^a
Acid 4-hidroxibenzoic	0,32 ± 0,20 ^a	3,89 ± 0,64 ^b
Cafeină	12,80 ± 0,77 ^a	8,62 ± 2,94 ^a
Epicatechină	23,98 ± 0,59 ^a	ND
Cafestol	<LOQ	<LOQ
Acid vanillic	<LOQ	<LOQ

Literele diferite în rând reprezintă diferențe semnificative între proba martor și proba optimizată. ND - Nedetectat; LOQ (din engl. Below the Limit of Quantification)- sub limita pragului de cuantificare

Acidul galic a fost compusul predominant în ambele probe, fiind identificat în concentrații de 105,51 µg/mL în proba martor (M₂) și 102,72 µg/mL în proba cu paraprobiotic (P₂). Nivelurile de acid protocatechuic au fost apropiate între cele două probe: 33,86 µg/mL în M₂ și 34,48 µg/mL în P₂. În schimb, acidul 4-hidroxibenzoic s-a regăsit într-o cantitate semnificativ mai mare în P₂ (3,89 ± 0,64 µg/mL) comparativ cu M₂ (0,32 ± 0,20 µg/mL), diferență semnificativă confirmată statistic (p = 0,001, R² = 0,955), ceea ce poate indica procese microbiene sau enzimatic care au facilitat eliberarea acestuia. Cafeina a fost prezentă în ambele mostre, însă într-o concentrație mai mare în M₂ (12,80 ± 0,77 µg/mL) față de P₂ (8,62 ± 2,94 µg/mL), ceea ce poate sugera o posibilă degradare parțială în timpul fermentației. În mostra M₂ au fost detectați acidul syringic (8,87 ± 0,63 µg/mL) și epicatechina (23,98 ± 0,59 µg/mL), însă acești compuși au lipsit din mostra P₂. Absența lor poate fi explicată prin posibile interacțiuni cu componentele paraprobiotice, ducând la formarea unor noi substanțe bioactive. În ambele probe, cafestolul și acidul vanilic au fost detectabili, dar în concentrații prea scăzute pentru a putea fi cuantificate cu exactitate, situându-se sub limita de detecție a metodei utilizate. Deși acidul galic și acidul protocatechuic au avut un profil comparabil în cele două mostre, anumiți compuși nu au fost identificați în P₂, deși erau prezenți

în M₂. Acest lucru sugerează că prezența paraprobioticelelor poate influența compoziția compușilor fenolici, probabil din cauza modificărilor survenite în procesul de fermentație.

Proprietățile senzoriale ale băuturii fermentate

Analiza senzorială a fost efectuată pentru probele cu proprietăți bioactive superioare, respectiv probele M₂ și P₂. În urma analizei senzoriale, pentru proba codificată P₂, s-au obținut următoarele punctaje: 3,8 pentru culoare, 2,33 pentru limpiditate, 3,13 pentru gust, 2,40 pentru carbonatare, 3,53 pentru aftertaste, 3,47 pentru textură, 2,60 pentru acceptabilitate, 2,73 pentru apreciere generală. Aceste date au fost reprezentate utilizând diagrama radar pe baza scalei hedonice cu cinci puncte (Figura 6.3).

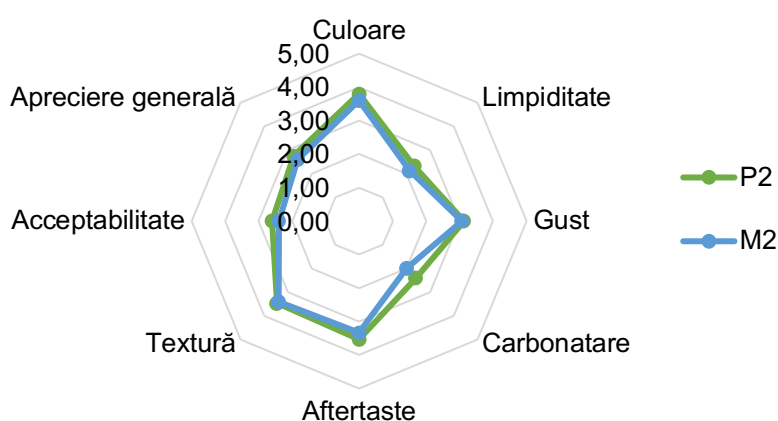


Figura 6.3. Atribute senzoriale ale probelor codificate P₂ și M₂

Proba a primit evaluări modeste, din cauza gustului intens de fermentat cu impact asupra gustului, texturii și aspectului. Kaszuba și colab., 2024, au obținut cvas din pâine de secară cu adaos de aditivi pe bază de plante. De asemenea, s-a efectuat evaluarea organoleptică (scala de 5 puncte) a limpezimii, mirosului, culorii și a gustului a produsului care au primit următoarele valori pentru proba martor (fără aditivi pe bază de plante), 3,8, pentru claritate; 4,1, pentru miros; 3,8, pentru culoare și 3,4, pentru gust, iar pentru probele cu aditivi s-au obținut următoarele medii 2,82, pentru claritate; 3,93, pentru miros; 3,12, pentru culoare; 3,60, pentru gust (Kaszuba et al., 2024). Un alt studiu efectuat de Lidmus și colab., 2016, a analizat caracteristicile senzoriale și piața de consum a cvasului obținut din pâine de secară, malt, acid lactic, zahăr și drojdiile *Kluyveromyces marxianus* și *Saccharomyces cerevisiae* pentru comparație. În ceea ce privește gustul cvasului, acesta a fost evaluat cu note între 4,1 („plăcut puțin”) și 5,0 („foarte plăcut”). Majoritatea consumatorilor (56%) nu ar consuma cvas obținut prin fermentație cu *K. marxianus*, în timp ce 60% dintre aceștia preferă cvasul fermentat cu *S. cerevisiae* datorită gustului său mai tradițional. Cvasul obținut prin fermentație cu drojdia *S. cerevisiae* a fost apreciat pentru aroma, aciditatea și aftertaste-ul său, în timp ce cvasul obținut prin fermentație cu drojdia *K. marxianus* a fost considerat lipsit de aciditate și aromă. Trebuie de menționat că băuturile comerciale denumite cvas sunt, în multe cazuri, diluții de concentrate de extract de cereale cu apă, coloranți și arome artificiale, iar cvasul fermentat natural conține mai puțin dioxid de carbon comparativ cu băuturile comerciale, care sunt carbonatate artificial (Lidums et al., 2016).

6.3.4. Concluzii parțiale

Băutura fermentată propusă, denumită MetaKvas, reprezintă un produs fermentat inovator cu potențiale beneficii nutriționale și bioactive. Utilizarea substratului fermentativ pe bază de făină de secară, fermentată natural cu bacterii lactice autohtone, asigură îmbogățirea produsului fermentat în prebiotice, probiotice și postbiotice. De asemenea, suplimentarea cu zaț de cafea și fermentarea suplimentară cu drojdie îmbunătățește caracteristicile tribiotice, iar adăugarea paraprobioticele completează compoziția metabiotică. Băutura fermentată obținută are proprietăți bioactive, însă proprietățile senzoriale trebuie îmbunătățite.

Capitolul 7. Concluzii finale

Teza de doctorat a avut ca obiectiv general studiul potențialului biotehnologic al microorganismelor din microbiomul culturilor starter artisanale, membrane de kombucha (engl. SCOBY- *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*), GCL și GCA, în scopul obținerii de bioingrediente cu proprietăți tehnologice și funcționale îmbunătățite, destinate utilizării în formule alimentare. De asemenea, s-a avut în vedere obținerea și testarea funcționalității paraprobioticele, cu scopul dezvoltării unor aplicații în industria alimentară.

Pe baza rezultatelor experimentale prezentate și a concluziilor parțiale detaliate la finalul fiecărui capitol, pot fi sistematizate următoarele concluzii generale:

✓ Progresele în domeniul biotehnologiei permit monitorizarea și analiza detaliată a culturilor artisanale, facilitând extinderea utilizării acestora pentru producerea de alimente funcționale inovative, sigure, sănătoase, îmbogățite în metabiotice. Microorganisme din microbiomul (microbiota) acestor culturi funcționează prin inter-relații mutuale, dezvoltând o activitate metabolică complexă cu impact în producerea de prebiotice, probiotice și postbiotice. Utilizarea culturilor artisanale și a substraturilor neconvenționale în producția de metabiotice este promițătoare pentru obținerea de alimente, furaje și nutraceutice, având potențialul de a îmbunătăți microbiocenoza intestinală, imunitatea organismelor și creșterea calității vieții. Culturile artisanale, precum granulele de chefir (lapte, apă) și membranele SCOBY, sunt valoroase datorită diversității microbiene și capacității acestor microorganisme de adaptare și protecție împotriva contaminării microbiene, contribuind la diversificarea funcțională a produselor alimentare, furajelor și nutraceuticelor, cu efecte benefice deosebit de valoroase atât *in vitro* cât mai ales *in vivo*.

✓ Un alt aspect intens studiat în literatură este valorificarea subproduselor alimentare și producția sustenabilă de produse alimentare sănătoase cu valoare adăugată și ingrediente alimentare. Procesele industriei alimentare generează subproduse încă bogate în nutrienți, care sunt adesea nevalorificate, uneori cu impact negativ în poluarea mediului înconjurător. Substraturile convenționale și neconvenționale pot fi transformate în produse fermentate funcționale prin metabolismul complex al microorganismelor prin fermentații controlate, cu scopul de a îmbunătăți biotizarea, adică de a crește conținutul de prebiotice, probiotice și postbiotice, și ulterior se pot obține și paraprobiotice. Această abordare contribuie la utilizarea mai eficientă a resurselor, având drept rezultat dezvoltarea de produse funcționale inovative, sănătoase și sustenabile, care oferă beneficii diverse pentru sănătatea organismelor vii și reduc impactul negativ asupra mediului înconjurător.

✓ Microbiota culturilor artisanale (membranele SCOBY și granule de chefir) conține surse valoroase și variate de tulpini bacteriene și de drojdii, cu potențial bioactiv și probiotic ridicat. În cadrul studiilor din teza de doctorat, au fost izolate și caracterizate morfologic 18 tulpini de bacterii lactice, 7 tulpini de drojdii și 2 tulpini de bacterii acetice. Selecția bacteriilor lactice s-a realizat pe baza capacității de a fermenta medii neconvenționale formulate din făină de linte roșie, coji de cartof dulce, okara și colostru bovin, evaluând performanțele metabolice relevante, precum: capacitatea acidifiantă, activitatea antioxidantă și proprietățile antimicrobiene împotriva unor microorganisme de alterare și cu impact în siguranța alimentară (mușegaiuri și bacterii). Ca urmare a acestor evaluări, au fost selecționate două tulpini de bacterii lactice, codificate MIUG BL80 și MIUG BL87, aflate în gestiunea Colecției de Microorganisme a platformei Bioaliment (acronym MIUG), din cadrul Facultății Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați, afiliată la infrastructura pan-europeană Microbial Resource Research Infrastructure (MIRRI; www.mirri.org).

✓ În urma evaluării caracteristicile probiotice, rezistență la pH scăzut (2,0 și 3,0), supraviețuirea în prezența sărurilor biliare (0,3% g/v), adaptabilitatea la simularea *in vitro* a digestiei gastro-intestinale, capacitatea de co-agregarea și lipsa activității hemolitice, a tulpinilor selecționate (codificate MIUG BL80 și MIUG BL87), s-a demonstrat potențialul probiotic al acestora și s-a certificat siguranța utilizării acestor tulpini. În urma identificării filogenetice s-a demonstrat că aparțin speciilor *Lacticaseibacillus paracasei* MIUG BL80 și *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* MIUG BL87.

✓ Produsele obținute prin utilizarea unei co-culturi starter formată din amestecul 4% membrane SCOBY și 2% GCL (în stare activă), prin fermentarea unui mediu compus din colostru bovin (1%), infuzie de ceai negru (2%) și zahăr (10%), au prezentat proprietăți funcționale superioare (activitate antioxidantă și antimicrobiană) comparativ cu cele obținute folosind co-cultura formată din membrane SCOBY (4%) și GCA (2%), într-un mediu format din infuzie de ceai negru (2%), zaharoză (10%) și stafide (3%). Diferențele observate pot fi atribuite prezenței peptidelor bioactive generate în urma fermentării colostrului. Acizii organici, precum acizii propionic, lactic și acetic, au fost identificați în produsele fermentate obținute în ambele variante experimentale. De asemenea, se sugerează că după o perioadă îndelungată de co-fermentare (35 de zile), în culturi succesive, poate conduce la denaturarea potențialului fermentativ și la reducerea viabilității și a vitalității microorganismelor din consorțiile culturilor starter. Acest fenomen ar putea fi cauzat de competiția intensă pentru resurse într-o populație microbiană suprapopulată, ceea ce poate conduce la inactivarea tulpinilor mai sensibile și la apariția stresului oxidativ.

✓ Utilizând metode de proiectare experimentală, modelare matematică și analiză statistică (Plackett-Burman și analiza suprafeței de răspuns), s-au optimizat parametrii biotehnologici pentru obținerea unui produs fermentat, cu un potențial biologic îmbunătățit, obținut prin fermentarea unui mediu compus din 6,27% (g/v) pulbere de colostru bovin, 1,64% (g/v) ceai negru, 7,5% (g/v) zahăr, inoculat cu 0,36% (g/v) cultură de GCL și 0,5% (g/v) membrane SCOBY liofilizate. Principalii parametri cu influență asupra acestor caracteristici s-au identificat concentrațiile de colostru bovin, infuzie de ceai negru și culturi starter în stare liofilizată. Produsul fermentat obținut în condițiile optime de fermentație a prezentat aciditate ridicată, o activitate antioxidantă de 2,42 μM ET/mL și o activitate antibacteriană de 8,0, 8,67 și 21,67 mm față bacteriile test *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* și respectiv *Bacillus subtilis*. Mai mult, s-a demonstrat că produsul fermentat conține postbiotice cu potențial

funcțional, precum: acizi organici (butiric - 67,33 mg/mL, acetic - 25,21 mg/mL, lactic - 24,39 mg/mL, citric - 5,77 mg/mL și izovaleric - 4,36 mg/mL) și compuși fenolici (acizi galic și cafeic - 7,40, respectiv 314,86 μ g/mL, epicatechină - 1062,69 μ g/L, quercetină - 18,20 μ g/mL și izorhamnetina - 2,97 μ g/mL). Produsul astfel obținut se recomandă ca un bioingredient valoros, cu multiple aplicații în formularea alimentelor și a furajelor, având un impact semnificativ asupra controlului proceselor de oxidare, alterării microbiene și a siguranței alimentare. De asemenea, aceste postbiotice au un impact deosebit *in vivo*, pentru creșterea calității vieții consumatorilor.

✓ În urma optimizării și analizei modelelor validate și a factorilor biotehnologici cu impact pozitiv, s-a obținut un produs fermentat cu un potențial biologic ridicat, prin co-fermentarea unui mediu compus din 3,52% (g/v) stafide, 1,0% (g/v) ceai negru și 5% (g/v) zahăr, cu consorțiile microbiene prezente în GCA, în concentrație de 0,2% (g/v) și membrane SCOBY în concentrație de 0,2% (g/v), în forma liofilizată. Printre principalele variabile independente (parametri biotehnologici) care influențează pozitiv calitatea produsului fermentat s-au identificat: concentrația de ceai, timpul de fermentare și concentrația de stafide. Produsul fermentat obținut a avut o aciditate ridicată de 375,83°Th și un pH de 3,25. De asemenea, în compoziția sa au fost identificați acizi organici precum: acetic- 8,72 mg/mL, butiric- 45,81 mg/mL, izovaleric- 0,88 mg/mL, și compuși polifenolici, inclusiv acizii: cafeic- 255,64 μ g/mL, galic- 39,68 μ g/mL, ferulic- 0,36 μ g/mL, clorogenic- 0,25 μ g/mL; rutin trihidrat- 568,93 μ g/mL, izorhamnetina - 11,94 μ g/mL și epicatechina- 1135,69 μ g/mL. Prezența acestor compuși susține potențialul funcțional al produsului obținut.

✓ Produsul fermentat optimizat, obținut prin fermentarea mediului format din 6,27% (g/v) pulbere de colostru bovin, 1,64% (g/v) ceai negru, 7,5% (g/v) zahăr, inoculat cu 0,36% (g/v) GCL și 0,5% (g/v) membrane SCOBY (culturi liofilizate), timp de 5 zile, la temperatura de 30°C, conținând acizi precum citric, acetic, izovaleric, galic și cafeic, precum și compuși bioactivi precum epicatechina, miricetina, isorhamnetina, hespiridina și quercetina a fost folosit (în stare liofilizată) la suplimentarea furajelor pentru sturioni. S-a demonstrat că acești compuși contribuie la îmbunătățirea apărării antioxidante a sturionilor, stimulând maturarea și creșterea eficienței hrănitoare. Integrarea produsului fermentat în furaje pentru sturioni (2 g/kg) a condus de asemenea la o performanță de creștere îmbunătățită, având ca rezultate o acumulare mai mare de biomasă și o eficiență mai bună a conversiei furajelor. Parametrii hematologici și biochimici analizați au indicat o activare probabilă a metabolismului, corelată cu concentrația de produs fermentat. De asemenea, suplimentarea hranei sturionilor cu NutriFerment contribuie la stimularea sistemului oxidativ prin creșterea producției de molecule GSH (glutation redus) și scăderea de molecule MDA (malondialdehidă) în țesuturi, ceea ce conduce la îmbunătățirea eficienței de creștere.

✓ S-au obținut și testat paraprobioticele derivate din tratamentul tulpinilor selecționate MIUG BL 80 și MIUG BL 87, prin diverse tehnici neconvenționale (încălzire ohmică, tratament cu ultrasunete) combinate cu tratament termic. Astfel, suspensiile de celulare care au fost tratate prin încălzire ohmică, utilizând o sursă de curent alternativ de 50 Hz, cu un gradient de tensiune de 20 V/cm și un timp de tratament de 15 minute, au prezentat o sensibilitate mai mare la tratamentul termic, la temperaturi de 65°C, 75°C și respectiv 85°C, comparativ cu celulele tratate prin ultrasunete (puterea de 100W, frecvența de 30 kHz, pulsații de 1, timp de 20 minute și amplitudinea de 80%). Astfel, celulele tratate prin încălzire ohmică au fost mai

susceptibile la inactivare termică, în timp ce ultrasunetele au avut un efect mai pronunțat asupra fragmentării celulare și eliberării compușilor celulari bioactivi.

✓ Rezultatele obținute modelarea cineticii de inactivare au demonstrat că, pentru obținerea paraprobioticele derivate din tulpina probiotică MIUG BL 80, condițiile optime sunt tratament cu ultrasunete la o intensitate de 80%, timp de 20 de minute, urmat de tratament termic la temperatura de 75°C, timp de 5 minute. Aceste condiții au fost validate statistic, confirmând eficiența lor în procesul de inactivare celulară.

✓ Evaluarea eficacității paraprobioticele Para80, obținut prin tratament combinat cu ultrasunete (intensitate de 80% timp de 20 de minute) și tratament termic (temperatura de 75°C, timp de 5 minute), s-a testat prin efectele sale asupra performențelor metabolice ale drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* utilizată ca model experimental. S-a demonstrat că suplimentarea mediilor de cultivare sau de fermentație cu 15% paraprobiotic exercită o influență benefică în procesele de multiplicare. În plus, adaosul de paraprobiotice au contribuit la menținerea viabilității celulelor în condiții de depozitare prelungită. Aceste beneficii sugerează un potențial benefic al paraprobioticele asupra celulelor eucariote.

✓ S-a elaborat un procedeu biotehnologic pentru obținerea unei noi băuturi fermentate conținând metabiotice. Astfel, substratul fermentativ constituit din 4% zaț de cafea, 2% zahăr, 10% aluat acid din făină integrală de secară (obținut tradițional, liofilizat), în apă de rețea, cu adaos de 15% paraprobiotic și 0,2% inocul de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* a fost fermentat timp de 48h, la temperatura de 28°C. Utilizarea aluatului acid din făină secară fermentată natural contribuie la suplimentarea în mediului fermentativ cu prebiotice, probiotice și postbiotice. În plus, suplimentarea cu zaț de cafea și fermentarea suplimentară cu drojdie îmbunătățesc caracteristicile tribiotice, iar adăugarea paraprobioticele completează profilul metabiotic al băuturii. Analiza HPLC a produsului finit a certificat prezența compușilor bioactivi precum cafestol, acid galic, catechin, acid protocatecuic, acid 4-hidroxi-benzoic, acid vanilic și cafeină. Caracteristicile senzoriale ale băuturii sunt influențate de ingredientele utilizate, impunându-se astfel optimizarea compozițională a mediului fermentativ, în acord cu preferințele consumatorilor privind atributele standard ale băuturii.

Capitolul 8. Contribuții originale și perspective de continuare a cercetărilor

Originalitatea tezei de doctorat, precum și perspectivele de continuare a cercetărilor, derivă din următoarele aspecte:

✓ Au fost izolate și analizate din punct de vedere morfologic și metabolic un număr de 18 tulpini de bacterii lactice, 7 tulpini de drojdii și 2 tulpini de bacterii acetice din microbiota specifică a consorțiilor microbiene, membrane de kombucha (SCOBY), GCL și GCA. Studiul s-a axat pe evaluarea proprietăților biotehnologice ale bacteriilor lactice, iar ulterior, două tulpini cu potențial probiotic au fost selecționate și identificate filogenetic ca tulpini ale speciilor *Lactocaseibacillus paracasei* (MIUG BL80) și *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* (MIUG BL87). Aceste tulpini sunt păstrate în Colecția de Microorganisme MIUG, o colecție cu relevanță națională și internațională.

✓ S-a demonstrat posibilitatea utilizării unor substraturi fermentative neconvenționale precum făină din linte roșie, coji de cartof dulce, okara și colostru bovin pentru obținerea de produse fermentate cu proprietăți bioactive valoroase.

✓ S-a demonstrat funcționalitatea microorganismelor din consorțiile culturilor starter artisanale în combinațiile membrane SCOBY și GCL; membrane SCOBY și GCA, pentru fermentarea mediilor neconvenționale, formulate din ceai negru, colostru bovin și zahăr sau ceai negru, stafide și zahăr.

✓ S-a demonstrat valoarea funcțională a produsului fermentat obținut prin utilizarea culturilor multiple din membrane SCOBY și GCL prin suplimentarea furajelor pentru specia de pește *Acipenser baerii* (sturionul siberian). Rezultatele obținute au demonstrat creșterea randamentului de biomasă și o eficiență mai bună a conversiei furajelor. Aceste studii, realizate în premieră în România, oferă o perspectivă valoroasă pentru continuarea analizei aprofundate a influenței produselor fermentate cu consorții microbiene din culturi artisanale asupra stimulării metabolice și creșterea calității vieții peștilor. Diversitatea derivă din compoziția substraturilor fermentative, diversitatea și dimensiunea inoculului și condițiile fermentative.

✓ O altă abordare originală a vizat obținerea de paraprobiotice derivate din bacterii lactice selecționate, izolate din microbiota granulelor de chefir, prin tratamente combinate încălzire ohmică și tratament termic și tratament cu ultrasunete și tratament termic. Aceste studii oferă perspectiva continuării cercetărilor privind obținerea și testarea eficacității paraprobioticelelor *in vivo* și *in vitro*.

✓ O altă contribuție originală a vizat integrarea paraprobioticelelor obținute prin tratamente combinate (ultrasunete-tratament termic) și a tribioticelelor (pre-, pro, și postbiotice) dintr-un aluat acid obținut tradițional din făină de secară, pentru formularea unei noi băuturi fermentate cu proprietăți metabiotice.

✓ Rezultatele obținute evidențiază caracterul inovator al conceptelor propuse și investigate, cu impact științific și aplicativ. Astfel, rezultatele obținute contribuie la aprofundarea cunoștințelor în domeniul aplicațiilor culturilor starter artisanale în biotehnologie și alimentație și, totodată, deschid noi direcții pentru implementarea principiilor economiei circulare pentru bioproducerea de noi produse și ingrediente funcționale cu valoare economică și impact în biotic deosebit.

Capitolul 9. Diseminarea rezultatelor

Diseminarea rezultatelor cercetărilor efectuate pe toată durata studiilor doctorale s-a concretizat în următoarele publicații în reviste sau edituri relevante din fluxul principal al publicațiilor sau comunicate la conferințe internaționale și naționale de prestigiu, după cum urmează:

1. **Marina Pihurov**, Mihaela Cotârleț, Daniela Borda, Gabriela Elena Bahrim, *The Effects of Non-Viable Probiotic Lactobacillus paracasei on the Biotechnological Properties of Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Sci. **2025**, 15, 9221. <https://doi.org/10.3390/app15169221> (FI=2,5).
2. **Marina Pihurov**, Mihaela Cotârleț, Nicoleta Balan, Daniela Borda, Gabriela Elena Bahrim, *Paraprobiotics from Water Kefir Grains Probiotic Strain: Obtainment and Innovative Approaches for Functional Fermented Beverages*. Applied Food Research. **2025**. Acceptat pentru publicare (FI=6,2)

3. **Marina Pihurov**, Bogdan Pacularu-Burada, Mihaela Cotârleț, Leontina Grigore-Gurgu, Daniela Borda, Nicoleta Stănciuc, Maciej Kluz, Gabriela Elena Bahrim. *Kombucha and Water Kefir Grains Microbiomes' Symbiotic Contribution to Postbiotics Enhancement*. Foods **2023**, Volume 12, Issue 13, 2581. <https://doi.org/10.3390/foods12132581> (FI=5,1).
4. Cotârleț, M., **Pihurov, M.**, Păcularu-Burada, B., Vasile, A., Bahrim, G., Grigore-Gurgu, L., *Selection of new lactobacilli strains with potentially probiotic properties*. The Annals of the University Dunarea De Jos of Galati. **2023**. Fascicle VI - Food Technology 47 (1), 27-50. (FI=0,7).
5. Rimniceanu Cristian, Cretu Mirela, Grecu Iulia Rodica, **Pihurov Marina**, Bahrim Gabriela Elena, Dediu Lorena *Effects of kombucha and milk kefir dietary supplements on the meat body composition of Siberian sturgeon (Acipenser baerii)*. **2023**. Series D. Anim. Scien., Vol. Lxvi, ISSN 2285-5750.
6. **Marina Pihurov**, Bogdan Pacularu-Burada, Mihaela Cotârleț, Gabriela Elena Bahrim. *Tailoring the Optimized Fermentation Conditions of SCOBY-Based Membranes and Milk Kefir Grains to Promote Various Functional Properties*. Foods **2022**, 11, 3107. (FI=5,1).
7. **Marina Pihurov**, Bogdan Păcularu-Burada, Mihaela Cotârleț, Mihaela Aida Vasile, Gabriela Elena Bahrim, *Novel Insights for Metabiotics Production by Using Artisanal Probiotic Cultures*. Microorganisms **2021**, 9(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112184> (FI=4,2).
8. **Marina Pihurov**, Mihaela Cotârleț, Gabriela Elena Bahrim, *The Promotion of Biotication in Controlled Fermentation Using Kefir Grains and Kombucha Membranes as Starter Cultures*. Cap. de carte **2024**. eBook: ISBN 9780850148459. 10.5772/intechopen.1007044
9. **Marina Pihurov**, Mihaela Cotârleț, Leontina Grigore-Gurgu, Dana Iulia Moraru, Neculai Patrichi, Maria Desimira Stroe, Gabriela Elena Bahrim, *Metabiotic ingredient obtained through the biotransformation of spirulina biomass with kombucha*, SCDS-UDJG 13th Edition, 12-13 of June **2025**, Galați, România.
10. **Marina Pihurov**, Mihaela Cotârleț, Leontina Grigore-Gurgu, Dana Iulia Moraru, Neculai Patrichie, Maria Desimira Stroe, Gabriela Elena Bahrim, *Integrating the spirulina biomass and wild consortia of microorganisms from artisanal cultures to obtain metabiotic ingredients for aquaculture*, SCDS-UDJG 13th Edition, 12-13 of June **2025**, Galați, România.
11. **Marina Pihurov**, Daniela Borda Mihaela Cotârleț, Gabriela Elena Bahrim, *Paraprobiotics resulting from inactivation of Lacticaseibacillus paracasei MIUG BL 80 probiotic strain by combined ultrasonic treatment and thermal treatment and associated mathematical models of the inactivation kinetics*, SCDS-UDJG 12th Edition, 6-7 of June **2024**.
12. **Pihurov, M.**, Desmira Stroe, M., Cotârleț, M., Vasile, A., Grigore-Gurgu, L., Moraru, D., Patriche, N., Bahrim, G., *Valorificarea culturilor starter artisanale și a biomasei algei Spirulina sp. pentru obținerea de noi ingrediente funcționale cu aplicații în acvacultură*, Simpozion: Utilizarea algelor pentru o acvacultură durabilă, ICDEAPA, 11 decembrie **2024**.
13. **Marina Pihurov**, Bogdan Păcularu Buradaa Mihaela Cotârleța Gabriela Elena Bahrim, *Symbio-functionality of two artisanal cultures co-fermentation for increasing the*

bioactive properties of the fermented products, SCDS-UDJG 10th Edition, 9-10 of June **2022**.

14. Cristian Rimniceanu, Mirela Cretu, Angelica Docan, **Marina Pihurov**, Gabriela Bahrim, Lorena Dediu, *Preliminary results regarding the supplementation of fish feed with fermented product with kombucha and milk kefir on growth performance of Siberian sturgeon (Acipenser baeri)*, SCDS-UDJG 10th Edition, 9-10 of June **2022**.
15. **Marina Pihurov**, Bogdan Păcularu-Burada, Mihaela Cotârleț, Mihaela-Aida Vasile, Leontina Grigore-Gurgu, Gabriela-Elena Bahrim. *Study of newly lactobacilli strains to be used as delivery systems for metabiotics*, NUTRICON, 8-10 iunie **2022**, Ohrid/Macedonia de Nord
16. **Marina Pihurov**, Bogdan Păcularu Burada, Mihaela Cotârleț, Gabriela Elena Bahrim, *Ingredient tribiotic obținut prin co-fermentare cu consorții de microorganisme din culturi artisanale (kombucha și GCL)*, Târg internațional de invenții și inovații Conferințele științifice "Inovaliment", 21-25 noiembrie **2022**
17. **Marina Pihurov**, *Tendințe moderne în utilizarea microorganismelor selecționate pentru creșterea calității vieții, Simbiofuncționalitatea dirijată a culturilor artisanale ca strategie de obținere a metabioticelor*, Workshop Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați, Facultatea Știința și Ingineria Alimentelor, 14 aprilie **2022**
18. **Marina Pihurov**, Mihaela Cotârleț, Aida Mihaela Vasile, Bogdan Păcularu-Burada, Gabriela-Elena Bahrim, *Lactic acid bacteria isolated from the artisanal cultures as postbiotics promoters by fermentation of unconventional substrates*, Simpozionul științific Probiotics, Prebiotics and New Foods, **2021**, Roma, Italia.
19. **Marina Pihurov**, Mihaela Cotârleț, Gabriela Elena Bahrim, *Targeting postbiotics in the fermented products by using artisanal starters combination as valuable promoters of food functionality*, SCDS-UDJG, 10-11 of June **2021**.
20. **Marina Pihurov**, Bogdan Păcularu-Burada, Mihaela Cotârleț, Aida Vasile, Nicoleta Stănciuc, Gabriela Elena Bahrim, *Metabiotics a novel concept in probiotic promotion for functional food and ingredient development*, SCDS-UDJG, 10-11 of June **2021**.
21. Vasile, A., Păcularu-Burada,B., **Pihurov,M.**, Cotârleț,M., Bahrim,E., **2021**. *Biotechnological parameters with impact on bovine colostrum tribiotication by fermentation with selected lactic acid bacteria*. The Euro-Aliment Symposium, October 7-8th 2021, Galați, Romania, Book of abstracts, pp.127-128, GUP University Press, ISSN 1843-5114.
22. Cotârleț, M., **Pihurov,M.**, Păcularu-Burada,B., Vasile,A., Bahrim,G., *Enhancement of the postbiotics production by lactic acid bacteria on agri-food residual substrates*, 11th Probiotics, prebiotics and new foods, Book of abstracts, pp. 77., **2021**, Rome, Italy.
23. **Pihurov, M.**, Păcularu-Burada, B., Vasile, A., Cotârleț, M., Bahrim, G., *Increasing the usage of agro-food byproducts through Lactobacillus spp. fermentation by using the Plackett-Burman Design*, **2021**, 10th Euroaliment.