

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT
REZUMAT

**Abordări moderne în obținerea culturilor starter
de bacterii lactice utilizabile în panificație, cu
impact tehnologic și funcțional**

Doctorand,
Bogdan PĂCULARU-BURADA

Conducător științific,
Prof.univ.dr.ing. Gabriela-Elena BHRIM

Seria I 1. BIOTEHNOLOGII Nr. 15
GALAȚI
2022

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT

**Abordări moderne în obținerea culturilor starter
de bacterii lactice utilizabile în panificație, cu
impact tehnologic și funcțional**

(Rezumatul tezei de doctorat)

Doctorand,

Bogdan PĂCULARU-BURADA

| | |
|-------------------------------|---|
| Președinte: | Prof.univ.dr.ing. Gabriela RÂPEANU |
| Conducător științific: | Prof.univ.dr.ing. Gabriela-Elena BAHRIM |
| Referenți științifici: | Prof.univ.dr.ing. Dan-Cristian VODNAR |
| | Prof.univ.dr.ing. Mircea-Adrian OROIAN |
| | Prof.univ.dr.ing. Iuliana BANU |

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

Domeniul fundamental ȘTIINȚE INGINERESTI

- 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 SSEF: **Știința sportului și educației fizice**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE UMANISTE ȘI ARTE

- 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 BIOLOGICE ȘI BIOMEDICALE

- Seria M: **Medicină**

Cuprins

| | |
|--|-----------|
| Introducere..... | 15 |
| I. STUDIUL DOCUMENTAR..... | 23 |
| <i>Abordări moderne privind implicațiile bacteriilor lactice în obținerea aluaturilor acide cu utilizări în panificație.....</i> | 23 |
| 1. Implicațiile bacteriilor lactice în obținerea aluaturilor acide cu utilizări în panificație..... | 24 |
| 1.1. Introducere..... | 24 |
| 1.2. Beneficiile nutriționale ale substraturilor fermentative..... | 27 |
| 1.3. Condiții biotehnologice pentru obținerea și utilizarea aluaturilor acide | 28 |
| 1.4. Impactul tehnologic și funcțional al compușilor postbiotici din aluatul acid | 31 |
| 1.4.1. Biosinteza exopolizaharidelor | 33 |
| 1.4.2. Îmbunătățirea proprietăților antioxidante și reducerea factorilor antinutriționali..... | 34 |
| 1.4.3. Efectul aluatului acid în stabilitatea microbiologică a produselor de panificație și asigurarea siguranței alimentare..... | 36 |
| 1.5. Perspective aplicative și în cercetarea fundamentală..... | 39 |
| Referințe bibliografice..... | 40 |
| II. STUDIUL EXPERIMENTAL..... | 49 |
| 2. Izolarea, caracterizarea și selecția unor tulpini de bacterii lactice cu utilizări în tehnologii neconvenționale din industria panificației..... | 50 |
| 2.1. Introducere | 50 |
| 2.2. Materiale și metode | 53 |
| 2.2.1. Reactivi, medii de cultură și materii prime..... | 53 |
| 2.2.2. Microorganisme și condiții de cultivare..... | 53 |
| 2.2.3. Evaluarea capacității acidifiante | 54 |
| 2.2.4. Evaluarea activității antimicrobiene a produselor fermentate | 55 |
| Activitatea antifungică | 55 |
| Activitatea antibacteriană..... | 55 |
| 2.2.5. Determinarea stabilității activității antimicrobiene a produselor fermentate după tratament termic și prin variația pH-ului..... | 55 |
| 2.2.6. Selecția preliminară a tulpinilor de bacterii lactice cu activitate enzimatică..... | 56 |
| Activitatea amilolică..... | 56 |
| Activitatea lipolitică..... | 57 |
| 2.2.7. Selecția preliminară a tulpinilor de bacterii lactice pe baza capacității de biosinteză a exopolizaharidelor..... | 57 |
| 2.2.8. Extracția exopolizaharidelor produse de bacteriile lactice | 58 |
| 2.2.9. Evaluarea proprietăților antioxidante ale exopolizaharidelor | 58 |

*Abordări moderne în obținerea culturilor starter de bacterii lactice utilizabile în panificație,
cu impact tehnologic și funcțional*

| | |
|--|-----|
| Activitatea antioxidantă prin metoda cu DPPH..... | 58 |
| Activitatea antioxidantă prin metoda cu ABTS | 59 |
| 2.2.10. Identificarea filogenetică a bacteriilor lactice..... | 59 |
| 2.2.11. Evaluarea caracterului probiotic al bacteriilor lactice..... | 59 |
| Evaluarea rezistenței la valori scăzute ale pH-ului..... | 59 |
| Evaluarea rezistenței în prezența sărurilor biliare | 60 |
| Evaluarea rezistenței la condițiile tractului gastro-intestinal simulat..... | 60 |
| Evaluarea activității hemolitice | 61 |
| Evaluarea rezistenței la antibiotice..... | 61 |
| Evaluarea capacității de coagulare..... | 61 |
| Evaluarea proprietăților antiapatogene | 62 |
| Evaluarea capacității de adeziune la celulele canceroase ale liniei celulare HT-29..... | 62 |
| Evaluarea citotoxicității | 63 |
| Determinarea concentrației de oxid nitric..... | 63 |
| 2.2.12. Analiza statistică | 64 |
| 2.3. Rezultate și discuții..... | 64 |
| 2.3.1. Izolarea și caracterizarea morfologică a tulpinilor sălbatice de bacterii lactice..... | 64 |
| 2.3.2. Evaluarea proprietăților tehnologice și funcționale ale noilor tulpini de bacterii lactice izolate..... | 71 |
| Capacitatea acidifiantă..... | 71 |
| Evaluarea proprietăților antimicrobiene ale produselor fermentate | 73 |
| Stabilitatea potențialului antimicrobian al mediilor fermentate, după tratament termic și prin variația pH-ului | 77 |
| Proprietățile enzimaticale ale tulpinilor de bacterii lactice | 82 |
| Producerea exopolizaharidelor | 84 |
| Studiul comparativ al eficienței tehnicilor de extracție a exopolizaharidelor | 86 |
| Proprietățile antioxidante ale exopolizaharidelor..... | 88 |
| 2.3.3. Evaluarea impactului factorilor biotehnologici cu influență în formularea aluatului acid fără gluten..... | 90 |
| 2.3.4. Caracterizarea filogenetică a bacteriilor lactice..... | 96 |
| 2.3.5. Potențialul probiotic al bacteriilor lactice | 97 |
| Rezistența la valori scăzute ale pH-ului | 97 |
| Rezistența în prezența sărurilor biliare..... | 98 |
| Rezistența la condițiile tractului gastro-intestinal in vitro | 99 |
| Activitatea hemolitică | 101 |
| Rezistența la antibiotice | 101 |
| Capacitatea de coagulare..... | 102 |

| | |
|---|------------|
| <i>Proprietățile antipatogene</i> | 102 |
| <i>Capacitatea de adeziune la suprafața celulelor epiteliale intestinale HT-29</i> | 103 |
| <i>Efectul citotoxic asupra celulelor epiteliale intestinale HT-29</i> | 103 |
| <i>Sinteza oxidului nitric</i> | 104 |
| 2.4. Concluzii parțiale | 105 |
| Referințe bibliografice | 106 |
| 3. Optimizarea condițiilor fermentative în vederea obținerii unui aluat acid fără gluten fermentat cu tulpini selecționate de bacterii lactice | 121 |
| 3.1. Introducere | 121 |
| 3.2. Materiale și metode | 123 |
| 3.2.1. <i>Reactivi, materii prime, microorganisme și condiții de cultivare</i> | 123 |
| 3.2.2. <i>Analiza proprietăților tehnologice și funcționale ale aluaturilor acide fără gluten</i> | 124 |
| <i>Evaluarea capacității acidifiante</i> | 124 |
| <i>Evaluarea proprietăților antifungice</i> | 124 |
| <i>Evaluarea proprietăților antibacteriene</i> | 125 |
| 3.2.3. <i>Optimizarea parametrilor biotehnologici pentru obținerea aluatului acid fără gluten</i> | 125 |
| <i>Selecția preliminară a factorilor biotehnologici semnificativi</i> | 125 |
| <i>Optimizarea procesului fermentativ aplicând metoda analizei suprafeței de răspuns (RSM)</i> | 126 |
| 3.2.4. <i>Studiul postbioticeilor produse în aluatul acid</i> | 127 |
| 3.2.5. <i>Analiza statistică</i> | 128 |
| 3.3. Rezultate și discuții | 128 |
| 3.3.1. <i>Optimizarea procesului fermentativ de obținere a aluatului acid cu proprietăți bioactive îmbunătățite</i> | 128 |
| <i>Selecția preliminară a parametrilor biotehnologici cu impact în procesul de fermentare</i> | 128 |
| <i>Optimizarea procesului fermentativ de obținere a aluatului acid</i> | 130 |
| 3.3.2. <i>Analiza compușilor postbiotici din aluatul acid obținut în condiții biotehnologice optimizate</i> | 138 |
| 3.4. Concluzii parțiale | 140 |
| Referințe bibliografice | 140 |
| 4. Obținerea unor alături acide fără gluten prin fermentare cu granule de chefir | 147 |
| 4.1. Introducere | 147 |
| 4.2. Materiale și metode | 148 |
| 4.2.1. <i>Reactivi, materii prime, granule de chefir și microorganisme indicator</i> | 148 |
| 4.2.2. <i>Realizarea în șarje succesive a proceselor fermentative</i> | 148 |
| 4.2.3. <i>Evaluarea proprietăților morfologice, tehnologice și funcționale ale aluaturilor acide</i> | 153 |
| <i>Analiza microstructurală prin microscopie electronică cu scanare (SEM)</i> | 153 |
| <i>Determinarea pH-ului și a acidității titrabile totale</i> | 153 |

Abordări moderne în obținerea culturilor starter de bacterii lactice utilizabile în panificație,
cu impact tehnologic și funcțional

| | |
|---|------------|
| Evaluarea proprietăților antifungice ale aluaturilor acide..... | 154 |
| Evaluarea proprietăților antioxidante ale aluaturilor acide..... | 154 |
| 4.2.4. Analiza compușilor postbiotici din aluaturile acide | 155 |
| 4.2.5. Analiza statistică | 156 |
| 4.3. Rezultate și discuții..... | 156 |
| 4.3.1. Analiza prin microscopie electronică cu scanare a culturilor starter artisanale și a aluaturilor acide liofilizate..... | 156 |
| 4.3.2. Variația pH-ului și a acidității titrabile totale a aluaturilor acide obținute prin fermentare cu culturi liofilizate din granule de chefir..... | 158 |
| 4.3.3. Activitatea antifungică a aluaturilor acide fără gluten fermentate cu granule de chefir..... | 162 |
| 4.3.4. Activitatea antioxidantă a aluaturilor acide fără gluten fermentate cu granule de chefir..... | 164 |
| 4.3.5. Compușii postbiotici biosintetizați în aluatul acid prin activitatea microorganismelor din microbiota granulelor de chefir..... | 165 |
| 4.4. Concluzii parțiale..... | 169 |
| Referințe bibliografice..... | 169 |
| 5. Testarea funcționalității aluatului acid în produse de panificație neconvenționale..... | 174 |
| 5.1. Introducere | 174 |
| 5.2. Materiale și metode | 175 |
| 5.2.1. Materii prime și reactivi | 175 |
| 5.2.2. Obținerea pâinii fără gluten | 176 |
| 5.2.3. Evaluarea proprietăților tehnologice și funcționale ale pâinii fără gluten..... | 177 |
| Evaluarea pH-ului și a acidității titrabile totale (TTA)..... | 177 |
| Evaluarea proprietăților texturale | 177 |
| Evaluarea stabilității microbiologice | 177 |
| Evaluarea comportamentului compușilor biologic activi în timpul digestiei in vitro..... | 177 |
| Evaluarea conținutului total de polifenoli..... | 178 |
| Evaluarea conținutului total de flavonoide..... | 178 |
| Evaluarea proprietăților antioxidante pe durata digestiei in vitro | 179 |
| Evaluarea proprietăților antioxidante prin metoda cu DPPH | 179 |
| Evaluarea proprietăților antioxidante prin metoda cu ABTS..... | 179 |
| Evaluarea digestibilității in vitro a amidonului..... | 180 |
| 5.2.4. Analiza senzorială a probelor de pâine fără gluten cu adaos de aluat acid..... | 181 |
| 5.2.5. Analiza statistică | 182 |
| 5.3. Rezultate și discuții..... | 181 |
| 5.3.1. Proprietățile tehnologice și funcționale ale pâinii cu adaos de aluat acid fără gluten obținut în condiții fermentative neconvenționale..... | 181 |
| Capacitatea acidifiantă..... | 181 |

*Abordări moderne în obținerea culturilor starter de bacterii lactice utilizabile în panificație,
cu impact tehnologic și funcțional*

| | |
|---|------------|
| <i>Analiza profilului textural al pâinii cu aluat acid fără gluten</i> | <i>183</i> |
| <i>Stabilitatea microbiologică a pâinilor fără gluten</i> | <i>184</i> |
| <i>Eliberarea compușilor bioactivi pe durata digestiei in vitro.....</i> | <i>185</i> |
| <i>Digestibilitatea in vitro a amidonului.....</i> | <i>193</i> |
| <i>5.3.2. Proprietățile senzoriale ale pâinilor fără gluten cu adaos de aluat acid.....</i> | <i>194</i> |
| <i>5.4. Concluzii parțiale.....</i> | <i>195</i> |
| <i>Referințe bibliografice.....</i> | <i>196</i> |
| 6. Concluzii generale..... | 202 |
| 7. Contribuții originale și perspective de continuare a cercetărilor..... | 205 |
| 8. Diseminarea rezultatelor..... | 206 |
| <i>ANEXA 1.....</i> | <i>209</i> |
| <i>ANEXA 2.....</i> | <i>212</i> |

Introducere

Bacterii lactice sunt studiate și utilizate în scopul obținerii produselor fermentate cu caracteristici tehnologice, funcționale și senzoriale specifice, cât și în vederea diversificării, conservării și asigurării siguranței alimentare a produselor și a ingredientelor alimentare. Proprietățile metabolice ale culturilor starter de bacterii lactice, corelate cu parametrii intrinseci și extrinseci ai proceselor de fermentare influențează calitatea produselor fermentate și potențialul metabiotic (prebiotice, probiotice, postbiotice și paraprobiotice) (Ranadheera și colab., 2022; Singhal și Chaudhary, 2021).

Compuși postbiotici biosintetizați de bacteriile lactice sunt intens studiați în literatura de specialitate datorită proprietăților lor cu impact tehnologic și funcțional, în această categorie fiind inclus orice compus organic solubil în apă, rezultat printr-un proces fermentativ, dar și componentele celulare eliberate în mediul de fermentare în urma autolizei sau ruperii învelișurilor celulare ale bacteriilor lactice (Shafipour Yordshahi și colab., 2020). Din categoria postbioticelor fac parte acizii organici (acizi grași cu catenă scurtă), exopolizaharidele, vitaminele și peptidele bioactive, dacă este dovedit efectul benefic pentru sănătatea consumatorilor prin ameliorarea simptomelor unor afecțiuni (Arora și colab., 2021).

Numeroase studii științifice evidențiază capacitatea pseudocerealelor și a leguminoaselor (amarant, quinoa, chia, hrișcă, mei, năut, fasole, soia), nevalorificate suficient în industria alimentară, de a substitui parțial sau total făina convențională de grâu în produsele de panificație, principalele beneficii fiind determinate de lipsa glutenului, un conținut bogat și echilibrat în proteine, aminoacizi, grăsimi nesaturate și săruri minerale (Yaver și Bilgiçli, 2019). Prin fermentația lactică și obținerea aluaturilor acide sunt îmbunătățite proprietățile nutritive și senzoriale ale materiilor prime aglutenice, modificările biochimice ale substraturilor de fermentare induse de culturile de bacterii lactice selecționate contribuie, de asemenea, la obținerea unor produse fermentate cu funcționalitate ridicată (Garrido-Galand și colab., 2021).

Totodată, diversificarea gamei de produse de panificație fără gluten cu adaos de alături acide, obținute prin fermentația controlată sau spontană a unor materii prime neconvenționale respectiv prin utilizarea culturilor artisanale neconvenționale pentru panificație (granule de chefir de lapte și de apă), conduce totodată la extinderea termenului de valabilitate, îmbunătățirea proprietăților texturale, fiind de asemenea îmbunătățite și beneficiile pentru sănătatea consumatorilor (Comasio și colab., 2019; Ito și Arai, 2021).

Având în vedere varietatea tulpinilor valoroase de microorganisme care pot fi izolate și selecționate pe baza unor proprietăți biotehnologice specifice, în funcție

de obiectivele urmărite, există în prezent multiple posibilități de biovalorificare a bacteriilor lactice împreună cu făinurile neconvenționale, ca substraturi fermentative, pentru obținerea produselor fermentate cu valoare adăugată, promovând principiile moderne ale economiei circulare, creșterea calității vieții și protecția mediului înconjurător.

Teza de doctorat intitulată **„Abordări moderne în obținerea culturilor starter de bacterii lactice utilizabile în panificație, cu impact tehnologic și funcțional”** a vizat izolarea unor tulpini performante de bacterii lactice și selecția acestora, împreună cu studiul unor culturi artisanale (granule de chefir) cu proprietăți tehnologice și funcționale specifice, în vederea utilizării ulterioare pentru obținerea aluaturilor acide și a produselor de panificație neconvenționale, fără gluten, cu stabilitate microbiologică extinsă, bogate în compuși postbiotici cu funcționalitate superioară.

Cercetările derulate pe durata stagiului doctoral au urmărit următoarele obiective științifice:

- Izolarea unor tulpini de bacterii lactice din matrici agro-alimentare și ecosisteme diverse, evaluarea capacității acestora de a fermenta substraturi aglutenice pe bază de făinuri din năut, quinoa și hrișcă, prin analiza spectrului postbiotic și antimicrobian, în diferite condiții de pH și temperatură, asupra microorganismelor de alterare din industria panificației (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp. și *Bacillus* spp), cât și studiul caracterului probiotic și analiza filogenetică pentru tulpinile de bacterii lactice performante.
- Identificarea parametrilor biotehnologici cu importanță majoră pentru obținerea unui aluat acid fără gluten cu funcționalitate îmbunătățită, prin modelare matematică și analiză statistică.
- Utilizarea culturilor artisanale de tip granule de chefir în procesul fermentativ de obținere al aluaturilor acide fără gluten, pe bază de năut, quinoa, hrișcă și okara și analiza comparativă a proprietăților aluaturilor acide obținute prin fermentație mixtă cu microorganisme multiple din consorțiile granulelor de chefir de apă și lapte, în vederea selecției celei mai competitive culturi artisanale, pentru utilizare în producerea aluaturilor acide fără gluten.
- Obținerea unor produse de panificație fără gluten, cu adaos de aluaturi acide, și evaluarea modificărilor, asupra proprietăților tehnologice și funcționale, determinate de substituția făinurilor din rețeta de fabricație.

Teza de doctorat este structurată în două părți, după cum urmează:

I. STUDIUL DOCUMENTAR, intitulat **„Abordări moderne privind implicațiile bacteriilor lactice în obținerea aluaturilor acide cu utilizări în panificație”** prezintă, într-un singur capitol, structurat în 5 subcapitole, cercetări recente din domeniul obținerii și utilizării aluaturilor acide, cu evidențierea compoziției

nutriționale a materiilor prime neconvenționale reprezentate de pseudocereale și leguminoase. Sunt sistematizate, de asemenea, caracteristicile metabolice ale culturilor starter de bacterii lactice și modalitățile prin care poate fi îmbunătățită capacitatea acestora de biosinteză a compușilor postbiotici, cu impact pozitiv asupra produselor de panificație cu adaos de aluaturi acide.

II. STUDIUL EXPERIMENTAL prezintă rezultatele investigațiilor originale realizate pe durata stagiului doctoral, și este structurat în patru capitole respectiv:

Capitolul 2 intitulat „*Izolarea, caracterizarea și selecția unor tulpini de bacterii lactice cu utilizări în tehnologii neconvenționale din industria panificației*” prezintă tehnicile de izolare ale tulpinilor de bacterii lactice din diferite surse naturale, diversitatea metabolică a acestora și efectul cultivării tulpinilor individuale, evaluat prin tehnica componentelor principale, asupra capacității acidifiante, a potențialului antimicrobian al mediului fermentat, în urma modificării valorii pH-ului sau a tratamentului termic a supernatantelor obținute după separarea biomasei. De asemenea, s-a realizat studiul comparativ al metodelor de extracție ale exopolizaharidelor produse de bacteriile lactice selecționate asupra randamentului biopolimerilor separați și ale proprietăților antioxidante ale acestora, fiind studiat și caracterul probiotic al bacteriilor lactice selecționate, împreună cu caracterizarea filogenetică a acestora.

„*Optimizarea condițiilor fermentative în vederea obținerii unui aluat acid fără gluten fermentat cu tulpini selecționate de bacterii lactice*” prezentată în **Capitolul 3** a avut ca scop identificarea parametrilor biotehnologici cu impact semnificativ în obținerea, prin fermentație lactică, a unui aluat acid fără gluten, cu ajutorul tehnicilor de modelare matematică Plackett-Burman și Metoda analizei suprafeței de răspuns, ceea ce a permis studiul interacțiunilor dintre variabilele independente (consistența aluatului, tipul și volumul inoculului folosit, cantitatea de okara adăugată sau temperatura și durata procesului fermentativ), asupra răspunsurilor (aciditatea titrabilă totală, activitatea antimicrobiană împotriva microorganismelor indicator *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium* spp. și *Bacillus* spp.). Aluatul acid realizat în urma validării modelului matematic obținut a fost caracterizat de proprietăți tehnologice și funcționale îmbunătățite, iar analiza HPLC a evidențiat, printr-o evaluare calitativă, modificările induse de fermentația lactică asupra conținutului de acizi grași cu catenă scurtă și compușilor biologic activi.

Culturile artisanale reprezentate de granulele de chefir de apă și granulele de chefir de lapte au fost utilizate și selecționate în scopul obținerii unor aluaturi acide fără gluten, iar rezultatele prezentate în **Capitolul 4**, intitulat „*Obținerea unor aluaturi acide fără gluten prin fermentare cu granule de chefir*”, demonstrează capacitatea acestor culturi starter artisanale, formate din consorții multiple de microorganisme benefice (bacterii și drojdii), de a fi utilizate în scopul atingerii obiectivelor biotehnologice propuse. Modificările consorțiilor de microorganisme, determinate de cultivarea pe substraturile aglutenice neconvenționale, au fost

evidențiate prin tehnici de microscopie electronică cu scanare (SEM) iar analiza cantitativă a compușilor postbiotici prin tehnici cromatografice HPLC a confirmat funcționalitatea produselor fermentate obținute, corelată cu efectul antifungic împotriva speciilor de mucegaiuri testate ca indicatori, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp.

Impactul substituției amestecului de făinuri de năut, quinoa și hrișcă cu aluaturile acide obținute prin fermentație lactică cu o cultură mixtă formată din tulpinile selecționate de bacterii lactice, respectiv prin fermentație cu o cultură selecționată, multiplă, de granule de chefir, a fost prezentat în **Capitolul 5** intitulat „**Testarea funcționalității aluatului acid în produse de panificație neconvenționale**”, în cadrul căruia s-a demonstrat efectul bioconservant al aluaturilor acide formulate cât și contribuția acestora la o eliberare controlată a compușilor biologic activi cu activitate antioxidantă și efect prebiotic în urma digestiei *in vitro*.

Fiecare capitol al studiului experimental este structurat în subcapitolele: *Introducere*, în care se prezintă stadiul actual al cercetării și sunt definite obiectivele studiilor realizate; *Materiale și metode*, unde sunt descrise materiile prime, materialele, reactivii utilizați și metodele de investigare, prelucrare și interpretare a datelor experimentale; *Rezultate și discuții*, în care sunt prezentate rezultatele obținute prin comparație cu alte date din literatura de specialitate; *Concluzii parțiale și Referințe bibliografice*.

Capitolul 6, Concluzii generale, prezintă concluziile finale rezultate în urma studiilor experimentale realizate, care au vizat elaborarea unor produse de panificație fără gluten, cu adaos de aluaturi acide, caracterizate prin proprietăți tehnologice și funcționale superioare, determinate de utilizarea făinurilor de năut, quinoa, hrișcă și okara, prin efectul metabolic al unor tulpini de bacterii lactice selecționate ale genului *Lactobacillus* spp. sau prin implicarea consorțiilor de bacterii și drozii din microbiota granulelor de chefir de apă selecționate.

Teza de doctorat cuprinde 213 pagini în care sunt incluse 40 figuri și 31 tabele. Studiul documentar reprezintă 12% iar partea experimentală 88%.

În final, sunt prezentate **contribuțiile originale** ale tezei de doctorat care contribuie la îmbogățirea conceptelor fundamentale și aplicative în domeniul studiat și perspectivele de continuare a cercetărilor, precum și diseminarea rezultatelor obținute. Astfel, rezultatele cercetărilor au fost valorificate prin elaborarea a **5 articole științifice** publicate, **3 articole** în reviste cotate ISI (*Microorganisms*, *Applied Sciences*, *LWT – Food Science and Technology*) și **2 articole** indexate în baze de date internaționale (*The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati*, *Fascicle VI – Food Technology* și *Innovative Romanian Food Biotechnology*), a **2 capitole** acceptate pentru publicare în cărți ale unor edituri internaționale și a unui număr de **17 comunicări** la manifestări științifice importante în domeniul biotehnologiei, din țară și din străinătate.

Activitățile de cercetare din cadrul tezei de doctorat au fost derulate cu ajutorul infrastructurii moderne de cercetare a *Centrului integrat de cercetare, expertiză și transfer tehnologic (BioAliment-TehnIA)* (www.bioaliment.ugal.ro), din cadrul Facultății Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați.

Pe parcursul studiilor doctorale, doctorandul a fost implicat în **3 proiecte** de cercetare și dezvoltare a competențelor antreprenoriale, cu tematici convergente tezei de doctorat, după cum urmează:

✓ **COST ACTION 18101/2019-2023** - *Sourdough biotechnology network towards novel, healthier and sustainable food and bioprocesses* (SOURDOMICS <https://sourdomics.com/en/>).

✓ **SMIS 123847/2019-2020** - *Exceleța academică și valori antreprenoriale - sistem de burse pentru asigurarea oportunităților de formare și dezvoltare a competențelor antreprenoriale ale doctoranzilor și postdoctoranzilor* (ANTREPRENORDOC; <http://www.antreprenordoc.ugal.ro/ro/>),

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

Teza de doctorat a fost realizată sub coordonarea științifică a doamnei prof.dr.ing. Gabriela-Elena BAHIM, în calitate de conducător de doctorat și a comisiei de îndrumare, cu următoarea componență: prof.dr.ing. Iuliana BANU, conf.dr.biol. Vasilica BARBU, conf.dr.ing. Mihaela Aida VASILE și conf.dr.ing. Luminița Anca GEORGESCU.

Capitolul 3. Optimizarea condițiilor fermentative în vederea obținerii unui aluat acid fără gluten fermentat cu tulpini selecționate de bacterii lactice

3.1. Introducere

Fermentarea spontană a făinurilor care provin din prelucrarea cerealelor, pseudocerealelor, leguminoaselor cât și a făinurilor care rezultă din prelucrarea diferitelor subproduse agro-alimentare poate contribui la diversificarea aluaturilor acide în privința proprietăților tehnologice și bioactive. Acestea pot fi folosite în procesul de obținere a produselor de panificație cu caracteristici senzoriale specifice, fără a pierde din vedere beneficiile tehnologice, nutriționale și funcționale induse de procesul fermentativ (Arora și colab., 2021; Gobbetti și colab., 2020; Novotni și colab., 2021). Culturi starter formate din tulpini selecționate de bacterii lactice au fost folosite în vederea obținerii aluaturilor acide, cu proprietăți care să contribuie la extinderea termenului de valabilitate al produselor de panificație, cât și pentru a îmbunătăți proprietățile texturale, nutritive și funcționale (Diowksz și colab., 2020; Sakandar și colab., 2019).

Proprietățile tehnologice și funcționale ale aluaturilor acide depind de factori multipli, cei mai importanți dintre aceștia fiind reprezentați de particularitățile metabolice ale tulpinilor de bacterii lactice utilizate în procesul fermentativ, respectiv de parametrii procesului de fermentare (Bartkiene și colab., 2019; Menezes și colab., 2020) și tratamentele ulterioare aplicate produselor fermentate (tratament la presiuni înalte, încălzire ohmică, ultrasonare, expunere la radiații UV) în scopul creșterii efectului determinat de compuşii post- sau paraprobiotici (Moradi și colab., 2020; Vallejo-Cordoba și colab., 2020).

Studiile de optimizare care au la bază diverse tehnici de proiectare a experimentelor și modelare matematică (Plackett-Burman – PBD; Metoda analizei suprafeței de răspuns – RSM) sunt utilizate frecvent în cercetările din industria alimentară și/sau biotehnologie (Ma și Wang, 2016).

Obiectivele specifice în această etapă a studiului au vizat stabilirea influenței unor parametri biotehnologici asupra procesului de fermentare în sistem semisolid, în condiții controlate, a unor făinuri fără gluten, folosind tulpini selecționate de bacterii lactice. Prin proiectarea experimentelor, modelare matematică și analiza statistică cu ajutorul tehnicilor PBD și RSM s-a urmărit obținerea unui aluat acid fără gluten cu proprietăți bioactive îmbunătățite.

3.2. Materiale și metode

Metodele de investigare au vizat:

- optimizarea procesului fermentativ de obținere a aluatului acid prin intermediul tehnicilor de modelare matematică și analiză statistică Plackett-Burman (*engl. Plackett-Burman Design*, PBD) și Metoda analizei suprafeței de răspuns (*engl. Response Surface Methodology*, RSM);
- evaluarea capacității acidifiante prin metoda titrimetrică;

- evaluarea proprietăților antifungice și antibacteriene pe baza gradului de inhibiție a tulpinilor indicator;
- evaluarea conținutului postbioticelor din aluatul acid optimizat prin metode cromatografice HPLC.

3.3. Rezultate și discuții

3.3.1. Optimizarea procesului fermentativ de obținere a aluatului acid cu proprietăți bioactive îmbunătățite

Selecția preliminară a parametrilor biotehnologici cu impact în procesul de fermentare

Pe baza acestor rezultate, șase variabile independente au fost selectate pentru optimizarea procesului fermentativ aplicând tehnica RSM, respectiv: consistența aluatului, volumul de inocul al tulpinilor de bacterii lactice *Lactiplantibacillus plantarum* MIUG BL 21 și *Lactiplantibacillus pentosus* MIUG BL 24, adaosul de okara, temperatura și durata fermentației (Păcularu-Burada și colab., 2021).

Optimizarea procesului fermentativ de obținere a aluatului acid

Factorii anterior selectați, respectiv **A** – Consistența aluatului, **B** – Volumul de inocul *Lpb. plantarum* MIUG BL 21 (% v/g), **C** – Volumul de inocul *Lpb. pentosus* MIUG BL 24 (% v/g), **D** – Adaosul de okara (% g/g), **E** – Durata fermentației (ore) și **F** – Temperatura de fermentare (°C), au fost incluși în analiza prin metoda suprafeței de răspuns (RSM).

Modelul matematic obținut prin analiza RSM a fost validat prin evaluarea simultană a tuturor răspunsurilor analizate, rezultatele fiind prezentate în **Tabelul 3.5**.

Tabelul 3.5. Validarea modelului matematic rezultat din analiza RSM

| Răspunsuri | Valoare previzionată | Valoare experimentală |
|--|----------------------|-----------------------|
| TTA, mL NaOH 0,10 N | 33,12 | 40,21±2,16 |
| Activitatea antifungică împotriva <i>A. niger</i> 1, % | 70,20 | 71,42±1,00 |
| Activitatea antifungică împotriva <i>A. flavus</i> 1, % | 94,30 | 95,00±0,50 |
| Activitatea antifungică împotriva <i>Penicillium spp.</i> 1, % | 94,70 | 95,71±0,70 |
| Activitatea antibacteriană împotriva <i>Bacillus spp.</i> 1, % | 100,00 | 100,00±0,00 |
| Dezirabilitate cumulată | 0,94 | - |

Prin modelare matematică și analiză statistică s-a identificat o combinație optimă a factorilor (variabilelor independente) cu impact asupra proprietăților produsului fermentat, astfel: consistența aluatului – 475; volum inocul *Lpb. plantarum* MIUG BL 21 – 2,90% (v/g); volum inocul *Lpb. pentosus* MIUG BL 24 – 5% (v/g); adaos de okara liofilizată – 16,90% (g/g); temperatura de fermentare – 31,40°C și durata fermentației – 66,10 ore.

Varianta optimizată a parametrilor biotehnologici studiați conduce la un bioproces caracterizat de o valoare a dezirabilității cumulate de 94%, ceea ce confirmă validarea statistică a rezultatelor obținute.

3.3.2. Analiza compușilor postbiotici din aluatul acid obținut în condiții biotehnologice optimizate

Aluatul acid fără gluten obținut în condiții biotehnologice optimizate a fost supus analizei cromatografice în fază inversă (RP-HPLC) pentru a evidenția conținutul în compuși postbiotici, acizi organici, acizi fenolici și flavonoide cu proprietăți bioactive. Rezultatele sunt prezentate în **Figura 3.5**, **Figura 3.6** și **Figura 3.7**.

Fermentația aluatului acid în condițiile optimizate stabile a determinat creșterea concentrației de acid lactic și propionic, identificați în peak-urile 3 și 6, după 66 de ore de fermentare la temperatura de 31,40°C, prin comparație cu proba martor (substratul nefermentat). Se poate concluziona astfel faptul că tulpinile de bacterii lactice starter au un metabolism heterofermentativ care poate contribui la îmbunătățirea proprietăților tehnologice și funcționale ale produselor fermentate (Moon și colab., 2018).

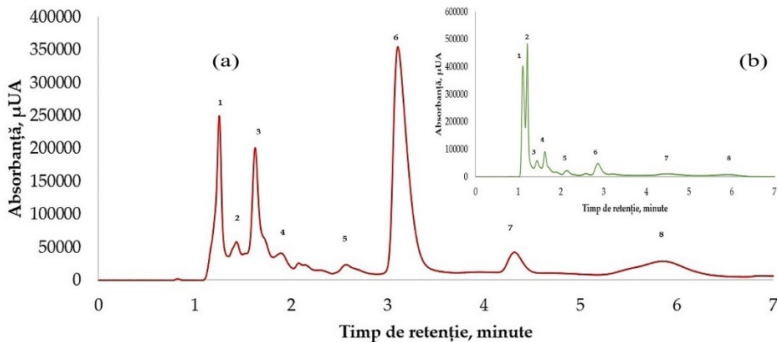


Figura 3.5. Cromatograme HPLC pentru separarea acizilor organici ($\lambda = 210$ nm) din aluatul acid obținut prin procedeul optimizat (a) și proba martor (mediu nefermentat) (b), pentru un volum de injecție de 20 μ L, dintr-o concentrație de probă de 400 mg/mL. Peak-uri: 3- acid lactic; 5- acid acetic; 6-acid propionic; 1, 2, 4, 7, 8 – compuși neidentificați

Totodată, s-a analizat compoziția aluatului acid obținut în condiții optimizate în acizi fenolici și flavonoide. Și în acest caz, pentru evidențierea modificărilor determinate de fermentarea controlată cu tulpini selecționate de bacterii lactice, a fost analizată în paralel o probă martor (mediu nefermentat). Datele prezentate în **Figura 3.6** și în **Figura 3.7** certifică beneficiile aduse de fermentația lactică în modificarea compoziției compușilor bioactivi din produsul fermentat. Astfel, din proba martor au fost separați 27 compuși bioactivi, concentrația acidului galic fiind superioară celei de quercitină. În proba fermentată au fost separați mai mult de 10 polifenoli, doar unii dintre aceștia având concentrații mai mari, determinate pe baza

intensității peak-urilor separate. Concentrația acidului vanilic este superioară în proba fermentată, prin comparație cu proba martor, cu o intensitate maximă identificată la lungimea de undă de 280 nm. În schimb, creșterea concentrației de acid ferulic din produsul fermentat cu bacterii lactice a fost determinată prin analiza cromatogramelor obținute la lungimea de undă de 320 nm.

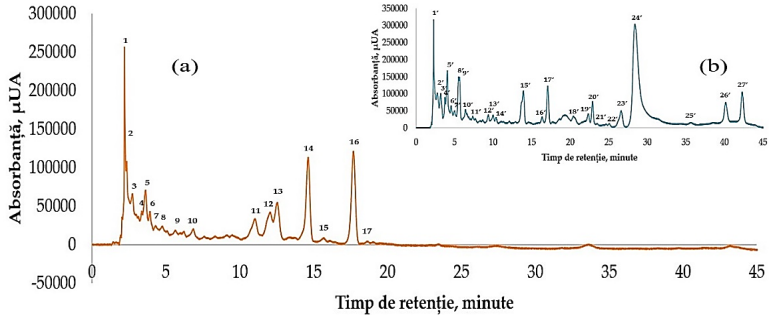


Figura 3.6. Cromatograme HPLC pentru separarea polifenolilor ($\lambda = 280 \text{ nm}$) din aluatul acid obținut prin procedul optimizat (a) și proba martor (b), pentru un volum de injecție de $10 \mu\text{L}$, dintr-o concentrație de probă de 400 mg/mL . Peak-uri: 9- acid cafeic; 10- acid vanilic; 12- acid ferulic; 1-8, 11, 13-17 – compuși neidentificați; 8'-acid clorogenic; 9'- acid cafeic; 10'- acid vanilic; 23'- quercitină; 24'- acid galic; 26'-epicatehină; 1'-7', 11'-22', 25', 27' – compuși neidentificați

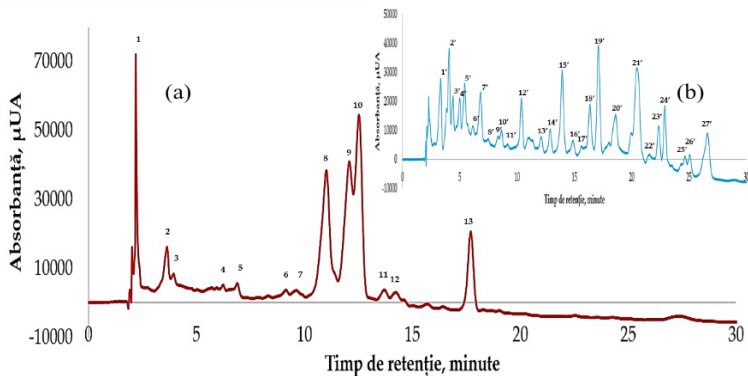


Figura 3.7. Cromatograme HPLC pentru separarea polifenolilor ($\lambda = 320 \text{ nm}$) din aluatul acid obținut prin procedul optimizat (a) și proba martor (b), pentru un volum de injecție de $10 \mu\text{L}$, dintr-o concentrație de probă de 400 mg/mL . Peak-uri: 4- acid vanilic; 9- acid ferulic; 1-3, 5-8, 10-13 – compuși neidentificați; 5'- acid clorogenic; 7'- acid vanilic; 13'- acid ferulic; 23'- quercitină, 24'- acid galic; 1'-4', 6', 8'-12', 14'-22', 25'-27' – compuși neidentificați

Se poate concluziona astfel că, procesul fermentativ optimizat de producere a aluatului acid fără gluten, utilizând ca starter tulpinile selecționate *Lpb. plantarum* MIUG BL 21 și *Lpb. pentosus* MIUG BL 24, în co-cultură, a condus la modificări benefice ale profilelor cromatografice ale compușilor bioactivi, cu impact deosebit asupra creșterii funcționalității produsului fermentat.

3.4. Concluzii parțiale

Cei mai importanți parametri biotehnologici cu impact în obținerea unui aluat acid fără gluten, neconvențional, realizat prin fermentarea controlată a mediului semisolid, au fost analizați cu ajutorul analizei statistice și modelării matematice folosind tehnicile PBD și RSM.

Prin formularea mediului fermentativ având la bază un substrat de fermentare steril formulat din făinuri aglutinice de năut, quinoa și hrișcă, suplimentat cu okara (borhot rezultat de la prelucrarea boabelor de soia), fermentarea în condiții controlate cu ajutorul culturilor de bacterii lactice selecționate (trei tulpini de lactobacili și o tulpină de *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides*), proiectarea experimentelor, modelarea matematică și analiza statistică, s-a elaborat un bioprocedeu optimizat de obținere a unui aluat acid aglutenic cu proprietăți bioactive îmbunătățite.

Principalele variabile independente (parametri biotehnologici) cu influență asupra calității produsului fermentat s-au dovedit a fi: consistența aluatului, compoziția și dimensiunea inoculului, adaosul de okara, durata procesului fermentativ și temperatura de fermentare. Astfel, aluatul acid cu proprietăți bioactive superioare se obține în următoarele condiții fermentative optimizate: consistența aluatului – 475; cantitatea de okara adăugată – 16,90% (g/g); volumul de inocul al tulpinii *Lpb. plantarum* MIUG BL 21 – 2,90% (v/g); volumul de inocul al tulpinii *Lpb. pentosus* MIUG BL 24 – 5% (v/g); temperatura de fermentare – 31,40°C; durata fermentației – 66,10 ore.

Efectele benefice ale transformărilor biochimice ai compușilor din compoziția substratului fermentativ, sub acțiunea culturilor starter selecționate (*Lpb. plantarum* MIUG BL 21 și *Lpb. pentosus* MIUG BL 24) cultivate în co-cultură, sunt certificate prin prezența compușilor postbiotici în produsul fermentat, în special a acizilor organici, acizilor polifenolici, flavonoidelor și derivaților acestora, cu efect pozitiv asupra proprietăților bioactive (activitatea antimicrobiană, activitatea antioxidantă etc.).

Rezultatele obținute pentru demonstrarea proprietăților antimicrobiene ale aluatului acid obținut prin procedeu de fermentare optimizat, creează premise pentru utilizarea eficientă a acestuia ca bioingredient în produsele de panificație și furaje, în vederea asigurării stabilității microbiologice extinse și a siguranței alimentare (prevenirea producerii de micotoxine în procesele de mucegăire) pentru aceste categorii de produse.

Capitolul 4. Obținerea unor aluaturi acide fără gluten prin fermentare cu granule de chefir

4.1. Introducere

Băuturile chefir fac parte din categoria produselor funcționale probiotice care oferă multiple beneficii pentru sănătatea consumatorilor. Cele mai importante efecte pozitive asociate unui consum regulat al acestor produse funcționale sunt legate de beneficiile *in vivo*, antimutagenice, antiinflamatoare, antimicrobiene, antioxidante etc. (Du și colab., 2021; Zeng și colab., 2022). Granulele de chefir sunt culturi starter artisanale care reunesco consoții sălbatice de microorganisme formate din tulpini de bacterii lactice, bacterii acetice, drojdii și bacteriofagi, care au activitate metabolică complexă, formând prin procese fermentative și de bioconversie compuși bioactivi (postbiotice), acizi organici, aminoacizi și peptide bioactive, vitamine, minerale și exopolizaharide cu proprietăți tehnologice și funcționale (Pihurov și colab., 2021).

În acest capitol s-a urmărit utilizarea diferitelor granule de chefir de apă sau lapte, liofilizate, ca inocul multiplu pentru obținerea, în condiții controlate de fermentare, a unor aluaturi acide fără gluten. Capacitatea de adaptare a consoțului microbial din granulele de chefir și proprietățile biochimice și funcționale ale acestuia au fost evaluate după fermentarea în condiții controlate a substratului format dintr-un amestec de făinuri de năut, quinoa, hrișcă și okara.

Alaturile acide obținute au fost analizate pentru evaluarea potențialului de inhibiție a dezvoltării unor mucegaiuri saprofite în panificație, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp. S-a urmărit, de asemenea, capacitatea de neutralizare a radicalului liber DPPH, respectiv modificările determinate de fermentația controlată cu granule de chefir asupra unor compuși postbiotici din compoziția mediului fermentat (acizi organici și compuși polifenolici). Totodată, s-a realizat o selecție a celor mai performante granule de chefir pentru fermentarea substratului formulat, prin multiplicări succesive în sisteme de fermentare cu mediul lichid (LSF) sau semisolid (SSF), utilizând ca inocul 0,20% (g/g) granule liofilizate sau 10% (g/g) produs fermentat. Această strategie a urmărit reducerea cantității de cultură starter și simplificarea procesului fermentativ pentru transpunerea în condiții industriale.

4.2. Materiale și metode

Metodele de investigare au vizat:

- selecția culturii artisanale performante prin cultivări succesive în sisteme de fermentare cu mediul lichid sau semisolid, în scopul obținerii aluatului acid fără gluten cu proprietăți bioactive îmbunătățite;
- analiza microstructurală a culturilor starter și a produselor fermentate prin microscopie electronică cu scanare (SEM);
- evaluarea pH-ului și a acidității titrabile totale;

- evaluarea proprietăților antifungice pe baza gradului de inhibiție a tulpinilor indicator;
- evaluarea proprietăților antioxidante prin metoda cu DPPH și ABTS;
- evaluarea conținutului postbioticele din aluaturile acide prin metode cromatografice HPLC.

4.2.2. Realizarea în șarje succesive a proceselor fermentative

Fermentațiile s-au realizat în trei șarje diferite, fiecare cu scop bine definit. Probele de aluat acid obținute, șarjele de fermentare și inoculul folosit pentru fermentații sunt descrise în **Tabelul 4.1**.

Tabelul 4.1. Codificarea și modalitatea de obținere a aluaturilor acide prin fermentații succesive în șarje

| Șarja de fermentare | Varianta experimentală | Inocul | Proba de aluat acid obținută |
|---------------------|------------------------|------------------|------------------------------|
| 1 | V1 | GKA1 (0,20% g/g) | A |
| | V1 | GKL (0,20% g/g) | B |
| | V2 | | C |
| | V3 | GKA1 (0,20% g/g) | D |
| | V2 | | E |
| | V3 | GKL (0,20% g/g) | F |
| | V2 | | G |
| | V3 | GKA2 (0,20% g/g) | H |
| 2 | V2 | GKA2 (0,20% g/g) | S1-S4 |
| | | S4 (10% g/g) | S5-S8 |
| | | S8 (10% g/g) | S9 |
| | | S9 (10% g/g) | S10 |
| | | | |
| 3 | V2 | GKA2 (0,20% g/g) | S1L |
| | | S1L (10% g/g) | S2L |
| | | S2L (10% g/g) | LSF |
| | | GKA2 (0,20% g/g) | S1F |
| | | S1F (10% g/g) | S2F |
| | | S2F (10% g/g) | SSF |

În prima șarjă de fermentare s-a realizat o selecție a culturilor artisanale de GKA și GKL liofilizate, având în vedere diferite tratamente preliminare aplicate substratului fermentativ (V1-V3).

Cea de a doua șarjă de fermentare a vizat evaluarea stabilității consorțiilor de microorganisme din cultura de GKA2 liofilizată, prin cultivări succesive în sistem LSF, având în vedere proprietățile pentru probele fermentate obținute (S1-S10).

În a treia șarjă de fermentare s-au realizat două multiplicări succesive urmate de termostatare în condiții aerobe la temperatura de 25°C, timp de 48 de ore, în sistem LSF, pentru a confirma eficiența produsului fermentat astfel obținut. Mai mult, în această șarjă de fermentare s-a evaluat impactul adaosului de okara asupra funcționalității aluaturilor acide, obținute prin fermentare în sistem SSF, în aceleași condiții biotehnologice (Păcularu-Burada și colab., 2021).

Aluaturile acide rezultate din toate cele trei șarje de fermentare, după 48 de ore de termostatare, în condiții aerobe, staționare, la temperatura de 25°C, au fost liofilizate și păstrate până la momentul analizelor specifice la temperatura de 4°C, în recipiente sterile, de culoare închisă, închise ermetic.

4.3. Rezultate și discuții

4.3.1. Analiza prin microscopie electronică cu scanare a culturilor starter artizanale și a aluaturilor acide liofilizate

Prin studiile morfologice ale microsistemelor granulelor de chefir, respectiv ale aluaturilor acide fără gluten, liofilizate, realizate cu ajutorul tehnicilor de microscopie electronică cu scanare (SEM), s-a evidențiat faptul că utilizarea inulinei ca agent crioprotector în procesul de liofilizare a GKA a adus beneficii consorțiului complex de microorganisme. Astfel, s-a putut observa formarea unor structuri specifice după liofilizare (**Figura 4.4a**), care au facilitat înglobarea naturală a microorganismelor. În interiorul acestor structuri formate se pot observa celule de bacterii, cu forma sferică (coci) sau în formă de bastonașe (bacili), așa cum se arată în **Figura 4.4b** și **Figura 4.4c**.

Stabilizarea granulelor GKL prin liofilizare cu inulină a determinat microorganismele din consorțiu să adere într-o primă etapă la polimerii formați în mod natural în asocierea consorțiului (kefiran), celulele fiind asociate de asemenea cu inulina, localizate la suprafața matricei liofilizate (**Figura 4.4d**). Imaginile SEM prezintă dominanța celulelor de drojdii, și bacterii cu celule de formă cilindrică și sferică, în diferite stadii de dezvoltare (**Figura 4.4e,f**). În procesul fermentativ s-au produs transformări calitative și cantitative ale microbiotei care au fost confirmate prin analiza SEM. Astfel, în produsul fermentat cu cultura liofilizată GKA2 au fost evidențiate relațiile sinergice dintre tulpinile de bacterii și drojdii, care pot fi explicate prin aderarea celulelor bacteriene pe suprafața celulelor de drojdii (**Figura 4.5a-c**). Pe de altă parte, în cazul utilizării ca inocul a culturii liofilizate GKL s-a observat o reducere a populației microbiene, acest efect ar putea fi atribuit incapacității de adaptare a microorganismelor din consorțiu la condițiile fermentative pentru obținerea aluatului acid, folosind făinuri aglutenice și okara ca substraturi fermentative (**Figura 4.5d-f**).

Rezultate similare au fost raportate de alți autori, care au observat variații calitative și cantitative în microbiota GKL sau GKA, în corelație cu originea geografică de proveniență a culturilor artizanale, condițiilor de fermentare (aerobioză sau anaerobioză, temperatură, durată) sau datorită compoziției substratului fermentativ (nutrienți, factori de creștere, compuși inhibitori, pH, a_w). S-a constatat totodată faptul că suplimentarea mediului de fermentare cu inulină sau fructe poate determina o selecție a microorganismelor din consorțiul GKA, predominând lactobaciliile și drojdiile (**Pendón și colab., 2021**). **Wang și colab. (2018)** au observat modificarea morfologiei bacteriilor lactice (*Lactobacillus* spp.) în funcție de condițiile biotehnologice (intrinseci, extrinseci și biologice). În acest studiu, predominanța lactobacililor, lungi sau scurți, a fost vizualizată atât la suprafața cât și în interiorul matricilor produselor fermentate liofilizate, ceea ce dovedește adaptabilitatea tulpinilor de bacterii lactice din cultura de GKA la substratul și condițiile de fermentare adoptate.

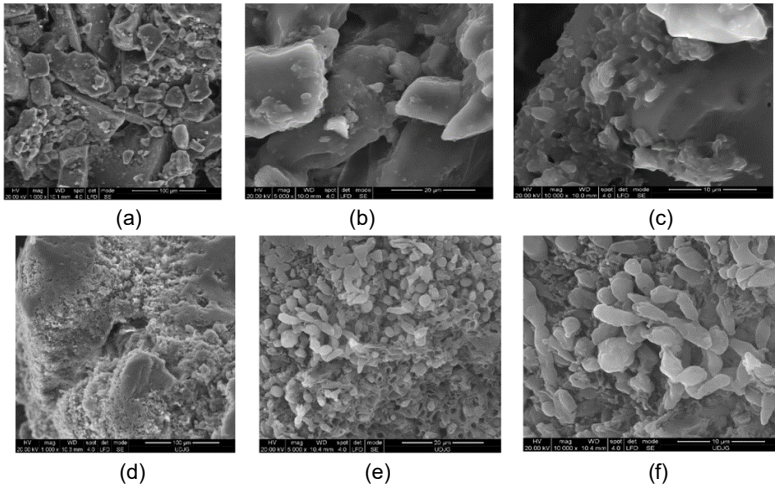


Figura 4.4. Imagini obținute prin analiza SEM a granulelor de chefir GKA2 (a-c) și GKL (d-f), liofilizate cu soluție 20% (g/v) inulină

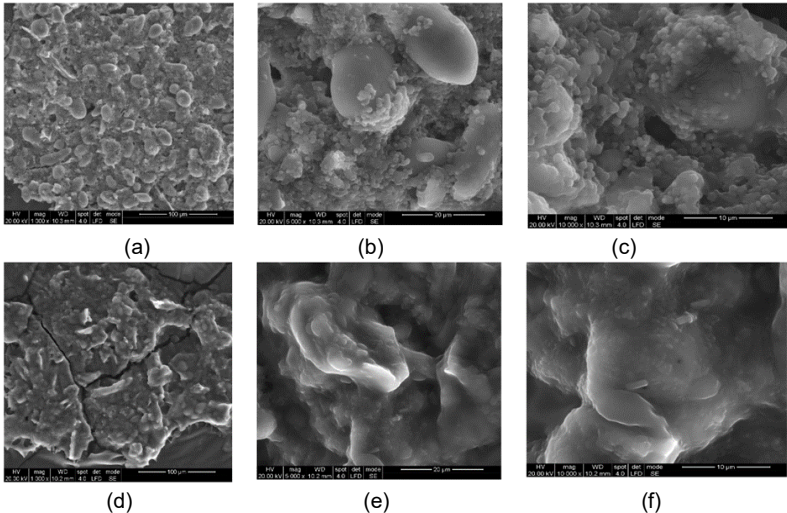


Figura 4.5. Imagini obținute prin analiza SEM a aluatului acid fermentat cu GKA2 (V2), proba G (a-c) și aluatului acid fermentat cu GKL (V1), proba B (d-f), din prima șarjă de fermentare

Celule de drojii observate prin analiza SEM a culturilor artisanale de GKL, cu forme sferice sau ovale, sunt asociate genurilor *Saccharomyces* spp., *Pichia* spp., *Kluyveromyces* spp., iar bacteriile cu formă cilindrică sau sferică aparțin genurilor *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. sau *Bacillus* spp. Toate

aceste microorganisme sunt nominalizate de literatură ca fiind incluse în microbiota consorțiilor complexe ale GKL (Bengoa și colab., 2019; Zeng și colab., 2022). Datele experimentale obținute în prezentul studiu sunt în acord cu cele raportate de Garofalo și colab. (2015), care au evidențiat prin analiza SEM diferențe între microbiota granulelor de chefir, cu privire la diversitatea microorganismelor și a raportului dintre bacterii și drojdii, aceste diferențe fiind influențate de numeroși factori, care țin de ecosistem și condițiile de utilizare în procese fermentative variate.

Pentru variantele biotehnologice propuse de obținere a aluatului acid prin fermentarea substraturilor formulate din făinuri aglutenice (năut, quinoa și hrișcă) cu adaos de okara, cea mai mare adaptabilitate au prezentat culturile liofilizate din GKA1 și GKA2, acestea fiind recomandate pentru utilizare ulterioară.

4.3.2. Variația pH-ului și a acidității titrabile totale a aluaturilor acide obținute prin fermentare cu culturi liofilizate din granule de chefir

Valorile pH-ului și acidității titrabile totale (TTA) sunt parametri importanți, în corelație cu stabilitatea microbiologică a produselor alimentare, efectele benefice fiind datorate compoziției acizilor organici cu rol antimicrobian demonstrat (acidul lactic, acidul acetic, acidul propionic, acizi grași nesaturați cu catenă medie etc.). Valorile pH-ului determinate pentru aluaturile acide fără gluten obținute în prima șarjă de fermentare (V1-V3), pentru care s-au folosit culturile starter liofilizate GKA1, GKA2 și GKL, au variat în intervalul 4,55-6,35 (Tabelul 4.2), pH-ul produsului fermentat fiind influențat de cultura starter folosită și de tratamentele preliminare aplicate substratului de fermentare.

În cea de a doua șarjă de fermentare, cultura liofilizată de GKA2 a fost utilizată pentru obținerea a zece variante de aluaturi acide prin fermentarea în sistem LSF, cu 0,20% (g/g) cultură starter pentru primele trei probe (S1-S3), respectiv 10% (g/g) mediu fermentat din proba S4, pentru inocularea celorlalte probe supuse fermentației. Valorile pH-ului pentru probele obținute în cea de a doua șarjă de fermentare au variat semnificativ între 6,40-6,52, atunci când au fost analizate aluaturile acide fermentate cu cultura GKA2 liofilizată și cele inoculate cu o cantitate de aluat acid obținut anterior din proba S4. Utilizarea unei cantități de inocul (10% g/g) obținut într-o fermentație anterioară a facilitat stabilizarea microbiotei culturii liofilizate GKA2, prin cultivarea succesivă pe substratul formulat. Rezultatele experimentale obținute au evidențiat faptul că inocularea substratului de fermentare cu un aluat acid obținut într-o fermentație anterioară, se poate realiza pentru alte două sau trei fermentații ulterioare.

După analiza aluaturilor acide din cea de a treia șarjă de fermentare, obținute după două multiplicări succesive, s-a constatat faptul că activitatea metabolică a microorganismelor din consorțiul GKA2 și caracteristicile produsului fermentat obținut, asociate cu valorile pH-ului și TTA, depind de compoziția mediului de fermentare și activitatea apei. Astfel, a fost determinată o valoare a TTA de 9,10 mL NaOH 0,10 N și un pH=6,00 pentru aluatul acid obținut prin fermentarea în sistem LSF, iar pentru aluatul acid obținut în sistem SSF s-a determinat o valoare mai mică a pH-ului (pH=5,83) și s-au folosit 18,20 mL NaOH 0,10 N pentru titrare (TTA), așa

cum se prezintă în **Tabelul 4.2**, ceea ce denotă eficiența utilizării substratului de fermentare mai concentrat, cu un conținut redus de apă.

Utilizarea GKL pentru fermentarea aluatului acid a fost studiată de către [Mantzourani și colab. \(2014\)](#), fiind raportat un pH cu valoarea 4,00 și un volum de 12 mL NaOH 0,10 N (TTA). Aceste valori au fost determinate după 48 de ore de fermentare, în condiții aerobe, la temperatura de 30°C, folosind un inocul format din 30% (g/g) GKL. Tulpini de bacterii lactice multiple (*Leuconostoc citreum*, *Weissella cibaria*, *Lactobacillus amylovorus*) au fost izolate și studiate pentru proprietățile lor tehnologice și funcționale în vederea obținerii aluaturilor acide cu caracteristici superioare. Astfel, pornind de la valori ale pH-ului de 6,10-6,40, s-a înregistrat o scădere pe perioada procesului fermentativ, până la pH=4,00, corelat cu o valoare a TTA mai mare de 10 mL NaOH 0,10 N ([Belz și colab., 2019](#); [Müller și colab., 2021](#)). De asemenea, s-a constatat faptul că durata fermentației, temperatura de fermentare și nutrienții din mediul fermentativ pot influența capacitatea acidifiantă a unor aluaturi acide fermentate spontan pe bază de făină de grâu sau porumb ([Adebo și colab., 2021](#); [Syrokou și colab., 2020](#)).

Rezultatele raportate în acest subcapitol pentru pH și TTA sunt comparabile cu cele determinate de [Drakula și colab. \(2021\)](#), respectiv pH-ul cu variații în jurul valorii 4,00 și cele mai bune valori ale TTA cuprinse între 15,41-18,97, acestea fiind determinate pentru aluaturi acide pe bază de făină de mazăre galbenă fermentate cu tulpini de lactobacili.

Tabelul 4.2. Caracteristicile aluaturilor acide fără gluten obținute prin fermentarea cu granule de chifir liofilizate, de apă (GKA) și de lapte (GL) a substraturilor neconvenționale (năut, quinoa, hrișcă și okara)

| Proba de aluat acid | Cultura starter | Varianta experimentală | Caracteristici ale aluaturilor acide | | | | | |
|------------------------------|-----------------|------------------------|--------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| | | | pH | TTA, mL NaOH 0,10N | Activitatea antifungică, I% | | | Activitatea antioxidantă (DPPH), I% |
| | | | | | <i>A. niger</i> | <i>A. flavus</i> | <i>Penicillium</i> spp. | |
| Sarja de fermentare 1 | | | | | | | | |
| A | GKA1 | V1 | 5,18±0,00 ^f | 30,00±0,60 ^{bc} | 44,51±3,60 ^f | 56,36±1,13 ^b | 57,82±5,81 ^b | 16,29±1,07 ^c |
| B | GL | | 4,56±0,01 ^f | 42,40±0,30 ^b | 5,49±0,64 ^d | 14,09±2,37 ^{ef} | 14,18±2,18 ^a | 17,58±0,20 ^f |
| C | GKA1 | V2 | 6,24±0,07 ^c | 22,90±0,08 ^{cd} | 61,19±3,66 ^b | 34,10±3,50 ^d | 29,54±0,45 ^f | 18,67±0,50 ^c |
| D | | V3 | 5,74±0,02 ^e | 23,60±0,20 ^{bc} | 100,00±0,00 ^a | 94,56±5,45 ^a | 100,00±0,00 ^a | 27,49±1,06 ^a |
| E | GL | V2 | 4,93±0,02 ^b | 38,00±0,20 ^b | n.d. | 5,45±0,90 ^f | n.d. | 18,19±1,05 ^c |
| F | | V3 | 4,81±0,01 ^e | 41,60±0,56 ^b | n.d. | 22,70±3,82 ^{ab} | 12,18±4,18 ^a | 21,92±0,81 ^d |
| G | GKA2 | V2 | 6,69±0,13 ^b | 10,90±0,15 ^{bc} | 100,00±0,00 ^a | 30,45±5,90 ^d | 100,00±0,00 ^a | 27,53±0,61 ^a |
| H | | V3 | 6,36±0,01 ^b | 12,33±0,00 ^b | 64,97±2,71 ^b | 40,00±3,94 ^c | n.d. | 28,63±2,70 ^a |
| Sarja de fermentare 2 | | | | | | | | |
| S1 | GKA2 | V2 | 6,48±0,00 ^{bc} | 8,80±0,15 ^{ab} | 100,00±0,00 ^a | 34,68±1,73 ^a | 76,04±3,88 ^a | 19,79±3,06 ^{ab} |
| S2 | | | 6,47±0,00 ^{bc} | 9,00±0,12 ^{ab} | 100,00±0,00 ^a | 30,83±1,17 ^{ab} | 67,71±5,67 ^a | 22,22±0,60 ^{ab} |
| S3 | | | 6,50±0,00 ^{bc} | 8,00±0,40 ^{cd} | 100,00±0,00 ^a | 25,08±1,26 ^{bc} | 40,22±3,83 ^a | 18,13±1,67 ^c |
| S5 | | | 6,47±0,00 ^{bc} | 9,20±0,70 ^{ab} | 100,00±0,00 ^a | 28,12±0,55 ^c | 100,00±0,00 ^a | 24,38±1,10 ^b |
| S6 | | | 6,44±0,01 ^{cd} | 9,60±0,13 ^{ab} | 100,00±0,00 ^a | 35,54±1,42 ^a | 100,00±0,00 ^a | 24,24±3,88 ^a |
| S7 | | | 6,40±0,00 ^f | 10,40±0,02 ^b | 100,00±0,00 ^a | 36,67±1,37 ^a | 100,00±0,00 ^a | 19,24±1,00 ^{bc} |
| S8 | | | 6,52±0,01 ^a | 7,90±0,70 ^{ab} | 100,00±0,00 ^a | 34,41±1,46 ^b | 100,00±0,00 ^a | 18,10±1,54 ^b |
| S9 | | | 6,52±0,00 ^{bc} | 7,00±0,40 ^c | 100,00±0,00 ^a | 24,17±2,64 ^c | 100,00±0,00 ^a | 17,63±1,23 ^b |
| S10 | | | 6,50±0,03 ^{cd} | 8,00±0,15 ^{cd} | n.d. | 13,54±1,30 ^d | 18,34±3,10 ^d | 21,34±0,47 ^{cd} |
| Sarja de fermentare 3 | | | | | | | | |
| LSF | GKA2 | V2 | 6,00±0,01 ^a | 9,10±0,10 ^a | 100,00±0,00 ^a | 100,00±0,00 ^a | 100,00±0,00 ^a | 17,86±1,99 ^b |
| SSF | | | 5,83±0,03 ^b | 18,20±0,30 ^b | 100,00±0,00 ^a | 100,00±0,00 ^a | 100,00±0,00 ^a | 25,91±2,00 ^b |

*Sistem de fermentare LSF; ** Sistem de fermentare LSF sau SSF. Valori medii pentru 3 determinări ± deviația standard. Literele diferite denotă diferențe semnificative pe coloranță având în vedere probele din aceeași sarja de fermentare; n.d. nedeterminat*

4.3.3. Activitatea antifungică a aluaturilor acide fără gluten fermentate cu granule de chefir

Rezultatele activității antifungice împotriva mucegaiurilor *A. niger*, *A. flavus* și *Penicillium* spp, determinate de aluaturile acide fără gluten fermentate cu granule de chefir au variat în funcție de tulpina de mucegai indicator. Totodată, adoptarea sistemului de inoculare în fermentații succesive a influențat potențialul inhibitor al produselor fermentate, în sensul îmbunătățirii activității antifungice după stabilizarea compoziției microbiene pe substratul de fermentare utilizat.

Variind tipul de cultură starter prin strategia de fermentare adoptată pentru prima șarjă de fermentare, în sistem LSF, s-au determinat rapoarte de inhibiție ale mucegaiului *A. flavus* cuprinse în intervalul 5,45-94,55%, induse de probele de mediu fermentat obținute (**Tabelul 4.2**).

Criteriul principal de selecție al aluaturilor acide performante, și implicit a culturilor starter liofilizate pe bază de GKA și GKL, a fost reprezentat de proprietățile antifungice determinate de produsele fermentate obținute, acordând atenție totodată și valorilor pH-ului, TTA, activității antioxidante și proprietăților senzoriale. Astfel, pentru studiile viitoare a fost selectată proba G de aluat acid, care răspunde cel mai bine cerințelor de calitate ale produsului fermentat referitoare la îmbunătățirea proprietăților tehnologice și funcționale.

Utilizarea ca ingredient antifungic a unei cantități de probă fermentată liofilizată (2% g/v) din probele de aluaturi acide S1-S9, a determinat inhibiția totală a mucegaiului *A. niger*, același efect fiind observat și pentru tulpina de *Penicillium* spp., atunci când au fost folosite aluaturile acide aferente probelor S5-S9. Valori cu variații în intervalul 35,54-36,67% au fost calculate pentru inhibiția mucegaiului *A. flavus* atunci când a fost folosit produsul fermentat liofilizat (2% g/v) provenit de la probele de aluat acid S6 și S7.

Cele două multiplicări succesive, adoptate în cea de a treia șarjă de fermentare, în sistemele LSF și SSF, cu cultura starter GKA2, au permis intensificarea biosintezei compușilor cu efect antifungic, care au inhibat total dezvoltarea mucegaiurilor indicator (**Figura 4.6**). În alte studii din literatură, tulpini aparținând genurilor *Lactobacillus* spp. și *Pediococcus* spp. izolate din microbiota GKL au fost capabile să inhibe în mod diferit tulpini ale mucegaiurilor *Penicillium* spp. sau *Aspergillus* spp., acest rezultat fiind influențat de spectrul acizilor organici biosintetizați (Farag și colab., 2020; Georgalaki și colab., 2021). Trebuie avut în vedere faptul că tulpinile de drojdii sunt parte componentă a microbiotei granulelor de chefir, acestea contribuind la proprietățile antifungice determinate de aluaturile acide asupra mucegaiurilor studiate, prin intermediul unor transformări enzimatiche ai compușilor din substratul de fermentare. S-a demonstrat că mediile fermentate cu tulpini de *Saccharomyces boulardii* au inhibat creșterea unor tulpini de *Aspergillus* spp. și *Penicillium* spp. (Goktas și colab., 2021; Purutoğlu și colab., 2020).

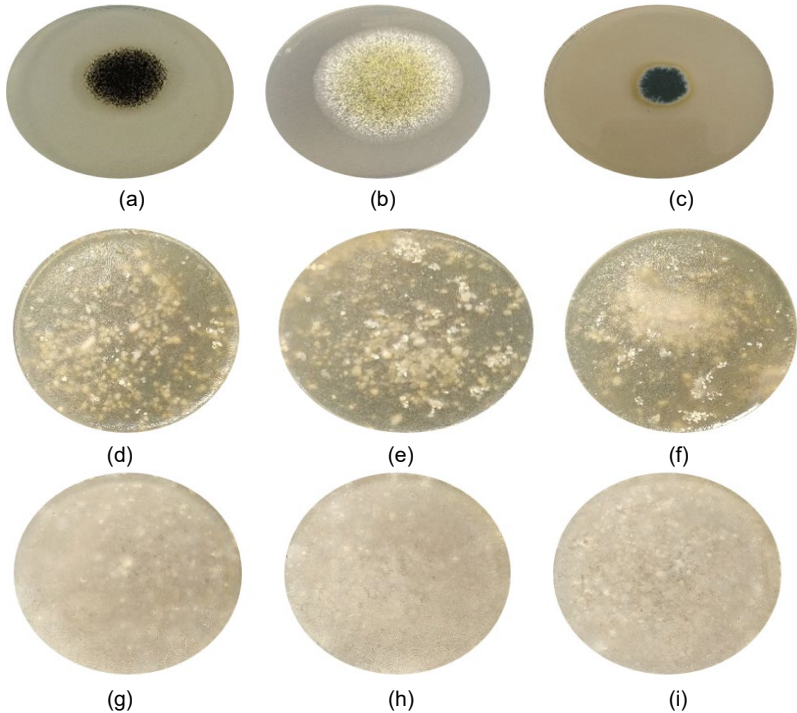


Figura 4.6. Activitatea antifungică a aluaturilor acide obținute în a treia șarjă de fermentare cu cultura starter GKA2, asupra mucegaiurilor indicator: *A. niger*, mator (a), aluat acid LSF (d) și aluat acid SSF (g); *A. flavus*, mator (b), aluat acid LSF (e) și aluat acid SSF (h); *Penicillium* spp., mator (c), aluat acid LSF (f) și aluat acid SSF (i)

4.3.4. Activitatea antioxidantă a aluaturilor acide fără gluten fermentate cu granule de chefir

Proprietățile antioxidante evaluate prin metoda cu DPPH ale aluaturilor acide fără gluten fermentate cu granule de chefir au variat în funcție de sistemul de fermentare (LSF sau SSF), culturile starter utilizate sau de tratamentele preliminare aplicate substraturilor înainte de inoculare. Cele mai bune grade de inhibiție ale radicalului liber DPPH, mai mari de 27%, au fost determinate de aluaturile acide obținute în prima șarjă de fermentare (LSF), fermentate cu culturile starter GKA1 și GKA2 (**Tabelul 4.2**). Folosirea ca inocul a mediului anterior fermentat (10% g/g), pentru inocularea unor noi substraturi de fermentare, a contribuit la îmbunătățirea proprietăților antioxidante. Astfel, au fost obținute valori maxime pentru inhibiția DPPH de 24,38% și 24,24% atunci când s-au folosit în experimente probele de aluat acid codificate S5 și S6, din a doua șarjă de fermentare în sistem LSF.

Rezultatele experimentale demonstrează, de asemenea, faptul că proprietățile antioxidante ale produselor fermentate s-au diminuat atunci când au fost realizate mai mult de două multiplicări succesive folosind 10% (g/g) inocul provenit din proba codificată S4. Astfel, aluatul acid obținut în cea de a treia șarjă de fermentare, în sistem LSF, a determinat o inhibiție a radicalului DPPH doar în proporție de numai 17,85%, atunci când s-au realizat două multiplicări succesive. S-a constatat totodată faptul că suplimentarea mediului de fermentare cu 16,89% (g/v) okara și consistența aluatului acid au determinat diferențe semnificative asupra proprietăților antiradicalice ale DPPH.

Aluatul acid obținut prin fermentare în sistem SSF (șarja de fermentare 3), cu ajutorul culturii starter GKA2, timp de 48 de ore, la temperatura de 25°C, în condiții aerobe, a determinat un grad de inhibiție al DPPH de 25,91% (**Tabelul 4.2**).

O serie de studii științifice s-au axat pe biovalorificarea sustenabilă a zerului de soia, culturi starter formate din GKA fiind utilizate pentru fermentarea acestui subprodus. Băuturile fermentate astfel obținute au fost caracterizate de un potențial antioxidant îmbunătățit, cu capacitatea de a inhiba radicalul liber DPPH în proporție de 40-80% (*Azi și colab., 2020a; Azi și colab., 2020b*). Aceste rezultate evidențiază importanța tulpinilor microbiene din consorțiul GKA, cât și variabilitatea spectrului fermentativ, în corelație cu compoziția chimică a substratului fermentativ și proprietățile metabolice ale culturilor starter. O activitate antioxidantă îmbunătățită poate fi determinată de conținutul în peptide bioactive, acizi fenolici sau flavonoide din compoziția substratului fermentativ, și de compușii formați prin activitatea biochimică a microorganismelor implicate în fermentare (*Gunenc și colab., 2017; Tu și colab., 2019*).

4.3.5. Compușii postbiotici biosintetizați în aluatul acid prin activitatea microorganismelor din microbiota granulelor de chefir

Probele de aluat acid obținute, în cea de a treia șarjă de fermentare, în sistemele de fermentare LSF și SSF, au fost analizate prin cromatografie HPLC în vederea separării, identificării și cuantificării unor compuși postbiotici cu impact în activitatea antimicrobiană și antioxidantă. Astfel, s-au evidențiat variații semnificative ($p < 0,05$) ale conținutului de acizi organici din probele de aluat acid obținute în sistemele de fermentare LSF și SSF, în cea de a treia șarjă de fermentare, după două multiplicări succesive și termostatarea în condiții aerobe, la temperatura de 25°C, timp de 48 de ore, folosind cultura starter liofilizată GKA2.

În aluatul acid obținut în sistem SSF, în mediul suplimentat cu 16,89% (g/v) okara, concentrațiile acizilor organici au fost superioare față de cele determinate pentru aluatul acid obținut în sistem LSF. Dintre acizii organici cuantificați prin analiză cromatografică HPLC în aluatul acid SSF, cea mai mare concentrație a fost determinată pentru acidul lactic (2357,56 mM/kg substanță uscată), urmat de acidul acetic (783,87 mM/kg substanță uscată), acidul citric (208,65 mM/kg substanță uscată), acidul propionic (169,70 mM/kg substanță uscată) și acidul butiric (8,97 mM/kg substanță uscată). Valorile calculate pentru randamentul fermentației (*engl. fermentation quotient*), prezentate în **Tabelul 4.3**, s-au încadrat în intervalul 3,01-

3,82, fără a fi identificate diferențe semnificative între probele fermentate în sistem LSF și în sistem SSF. Un randament al fermentației cuprins între 1,50-4,00 poate determina îmbunătățiri ale proprietăților senzoriale și texturale asociate produselor de panificație cu adaos de aluat acid (Galli și colab., 2019).

Rezultatele obținute în acest studiu pentru randamentul fermentației sunt comparabile cu cele raportate în alte studii științifice din literatura de specialitate pentru aluaturi acide pe bază de grîș sau mei (Gaglio și colab., 2021; Wang și colab., 2019). Trei aluaturi acide stabile microbiologic, provenite din diferite brutării artisanale, au fost caracterizate de concentrații ale acidului acetic cuprinse între 39-99 mM/kg aluat acid, respectiv concentrații ale acidului lactic în intervalul 53-85 mM/kg aluat acid. S-a demonstrat că acești acizi organici din produsele fermentate pot asigura stabilitatea microbiologică, cu impact asupra extinderii termenului de valabilitate al produselor de panificație cu adaos de aluat acid, atunci când acizii se găsesc în forme nedisociate în produsele finite obținute (Debonne și colab., 2020).

Utilizarea culturii liofilizate de GKA2 în bioprocese controlate s-a demonstrat a fi eficientă în scopul obținerii aluaturilor acide bogate în compuși postbiotici (acizi organici și polifenoli). Zongo și colab. (2020) au studiat activitatea metabolică a unei culturi de GKA în vederea obținerii unui chefir de apă cu adaos de sevă de palmier. În băutura fermentată au fost identificați acizi organici multipli (acid acetic, acid citric, acid lactic, acid piruvic, acid propionic, acid succinic) care contribuie la siguranța alimentară, proprietățile senzoriale și funcționale. Analiza cromatografică HPLC s-a realizat și pentru separarea compușilor biologic activi atât din aluaturile acide fără gluten cât și din substraturile nefermentate. Conținutul de acid galic a crescut semnificativ ($p < 0,05$) de la 302,62 $\mu\text{g/g}$ substanță uscată sau 512,62 $\mu\text{g/g}$ substanță uscată în probele nefermentate, până la 1384 $\mu\text{g/g}$ substanță uscată respectiv 1446,50 $\mu\text{g/g}$ substanță uscată în aluaturile acide obținute în sistem LSF respectiv SSF. Mai mult, concentrația de epicatehină din aluaturile acide LSF și SSF a fost îmbunătățită, concentrațiile maxime determinate fiind cuprinse între 18238-23798 $\mu\text{g/g}$ substanță uscată (Tabelul 4.4).

Cuantificarea compușilor bioactivi din probele fermentate analizate (Tabelul 4.4), a evidențiat influența parametrilor de fermentare optimizați în acest studiu asupra îmbunătățirii compoziției în compuși biologic activi. Prin urmare, în aluatul acid obținut prin fermentarea în sistem SSF, cu ajutorul culturii starter GKA2, s-a îmbunătățit potențialul antioxidant, în timp ce, pentru aluatul acid obținut în sistemul LSF s-a observat o modificare a spectrului acestor compuși bioactivi.

Tabelul 4.3. Compoziția acizilor organici și randamentul fermentației pentru alaturile acide fără gluten (fermentare în sistem LSF sau SSF, V2, cu cultura starter GKA2 liofilizată) și probele maror (substraturi nefermentate) în a treia sașă de fermentare

| Proba | Acizi organici (mM/kg substanța uscată) | | | | | Randamentul fermentației |
|----------------------------------|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| | Acid lactic | Acid acetic | Acid citric | Acid propionic | Acid butiric | |
| Produs fermentat în sistemul LSF | 1510,77±2,40 ^a | 592,21±3,60 ^a | 83,54±0,75 ^c | 48,49±0,49 ^a | 3,47±0,00 ^a | 3,82±0,02 ^c |
| Maror LSF (substrat nefermentat) | 42,14±1,20 ^a | 2,54±0,00 ^a | 194,52±0,94 ^b | nd. | nd. | 24,83±0,71 ^b |
| Produs fermentat în sistemul SSF | 2357,56±0,80 ^a | 783,87±1,20 ^a | 208,65±0,37 ^a | 169,70±0,49 ^a | 8,97±0,41 ^a | 3,01±0,00 ^c |
| Maror SSF (substrat nefermentat) | 523,70±0,00 ^c | 15,29±0,00 ^c | 73,66±0,19 ^a | 21,34±0,00 ^c | nd. | 51,39±0,00 ^b |

Valori medii pentru 3 determinări ± deviația standard. Literele diferite denotă diferențele semnificative pe coborâre, n.d. nedeterminat

Tabelul 4.4. Concentrații ale polifenolilor în alaturile acide fără gluten obținute prin fermentare în sistem LSF sau SSF (V2) cu ajutorul culturii liofilizate GKA2 și ale probelor maror (substraturilor nefermentate) în a treia sașă de fermentare

| Compus bioactiv, μg/g substanță uscată | Concentrații determinate la lungimea de undă: | | | | | | | |
|--|---|----------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| | 280 nm | | 320 nm | | 280 nm | | 320 nm | |
| | Proba | | | | | | | |
| | Produs fermentat în sistemul LSF | Maror LSF | Produs fermentat în sistemul LSF | Maror LSF | Produs fermentat în sistemul SSF | Maror SSF | Produs fermentat în sistemul SSF | Maror SSF |
| Acid galic | 1384,00±29,00 ^{aA} | 51262±16,17 ^{dB} | 2848,00±56,10 ^{aA} | 1153,37±99,64 ^{dB} | 1446,50±94,30 ^{aA} | 303,62±0,88 ^{dB} | 1525,92±12,66 ^{dB} | 669,20±39,70 ^{dB} |
| Epicatehină | 18238,00±20,09 ^{dB} | 217240±35,50 ^{DC} | nd. | 11615,54±27,17 ^{aA} | 23798,00±48,00 ^{aA} | 17731,00±36,00 ^{dB} | 12425,00±41,00 ^{aA} | 10559,30±19,20 ^{dB} |
| Acid cafeic | nd. | nd. | nd. | nd. | 100,35±4,18 ^{aA} | nd. | 66,16±4,42 ^{aA} | nd. |
| Miricetină | nd. | nd. | nd. | nd. | 96,38±124 ^{dB} | 599,20±9,53 ^{aA} | nd. | 1937,17±70,86 ^{aA} |
| Hesperidină | nd. | nd. | nd. | nd. | 927,30±28,80 ^{aA} | 97,33±4,30 ^{dB} | 589,30±41,90 ^{dB} | 2155,90±54,10 ^{aA} |
| Quercetin 3-β-D-glucozid | nd. | nd. | nd. | nd. | 138,56±5,91 ^{dB} | 495,70±4,45 ^{aA} | nd. | 476,48±2,86 ^{aA} |
| Apigenină | 1,46±0,20 ^{dB} | 2,47±0,06 ^{aA} | 0,34±0,00 ^{DC} | 0,59±0,05 ^{dB} | 1,36±0,03 ^{dB} | 2,04±0,01 ^{aA} | nd. | 0,76±0,01 ^{aA} |

Abordări moderne în obținerea culturilor starter de bacterii lactice utilizabile în panificație, cu impact tehnologic și funcțional

| Compus bioactiv, μg/g substanță uscată | Concentrații determinate la lungimea de undă: | | | | | | | |
|--|---|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|---|------------------------------|---|------------------------------|
| | 280 nm | | 320 nm | | 280 nm | | 320 nm | |
| | Proba | | | | | | | |
| | Produs fermentat în sistemul LSF | Maror LSF | Produs fermentat în sistemul LSF | Maror LSF | Produs fermentat în sistemul SSF | Maror SSF | Produs fermentat în sistemul SSF | Maror SSF |
| Isorhametină | 103,35± 5,24 ^{BA} | 97,96± 2,00 ^{BA} | 0,65± 0,04 ^{EB} | nd. | 52,70± 0,51 ^{BC} | 79,72± 0,43 ^{EB} | nd. | 2,34± 0,21 ^{BA} |
| Quercitină | nd. | 75,82± 0,06 ^{BA} | nd. | nd. | nd. | nd. | nd. | 72,88± 0,21 ^{BA} |
| Acid vanilic | nd. | nd. | nd. | 80,85± 0,46 ^{BA} | nd. | nd. | nd. | nd. |
| Kaempferol | nd. | 24,94± 1,57 ^{BA} | nd. | 3,49±0,04 ^{BA} | nd. | nd. | nd. | nd. |

Valori medii pentru 3 determinări ± deviația standard. Literele mici diferite denotă diferențe semnificative dintre aluatul acid și proba maror la aceeași lungime de undă, iar literele mari diferite denotă diferențe semnificative dintre probele analizate la aceeași lungime de undă; n.d. nedeterminat

Concentrația acidului cafeic determinată într-un aluat acid pe bază de făină de sorg a crescut de la 45,80 $\mu\text{g/g}$ la 183,40 $\mu\text{g/g}$, după fermentarea cu o tulpină de *Weissella confusa*, rezultat care este în concordanță cu datele experimentale determinate pentru aluatul acid obținut în sistem SSF, prezentate în acest capitol al tezei de doctorat. Aceeași tendință s-a observat și în cazul concentrației isorhamnetinei în aluatul acid obținut în sistem LSF, în timp ce cantitatea derivaților de quercitină a scăzut în aluatul acid pe bază de făină de sorg realizat de Wang și colab. (2020). Prin fermentația în sistem SSF a făinii de soia cu o tulpină de *Lactobacillus casei* s-a evidențiat o creștere a conținutului de acid galic în produsul fermentat (Li și colab., 2020), comportament care a fost observat și în acest studiu, în cazul aluaturilor acide fără gluten obținute prin fermentație cu cultura GKA2, prin conducerea procesului fermentativ în sistem LSF sau SSF.

În aluatul acid obținut prin fermentație în sistem SSF, glicozizii, respectiv β -glucozidele și agliconii, din compoziția okarei au fost utilizați nutrițional de microorganismele din consorțiul culturii GKA (Tu și colab., 2019). Acizi hidroxibenzoici și hidroxicinamici rezultați într-un produs pe bază de fructe, fermentat cu tulpini de *Pediococcus pentosaceus* sau *Lactobacillus plantarum*, au avut proprietăți antifungice, eficiența fiind dependentă de concentrație (Omedi și colab., 2019). Diversitatea și concentrațiile compușilor biologic activi din probele fermentate analizate sunt influențate de factori multipli, cei mai importanți dintre aceștia fiind reprezentați de tipul și concentrația culturii starter, compoziția substratului de fermentare, sistemul de fermentare și o multitudine de factori intrinseci, extrinseci și biologici, care intervin mai ales în cazul proceselor cu sterilitate comercială.

4.4. Concluzii parțiale

S-a urmărit evaluarea potențialului culturilor artisanale (granule de chefir de lapte și de apă) pentru a fi utilizate în calitate de culturi starter în procesul de fermentare a unor făinuri fără gluten (năut, quinoa, hrișcă și okara) pentru obținerea aluatului acid cu proprietăți bioactive îmbunătățite. A fost evaluată și demonstrată capacitatea acestor consorții naturale de microorganismele de adaptare și stabilitatea proprietăților biochimice și funcționale, prin utilizarea în fermentații succesive realizate în șarje, cu perpetuarea inoculului, în scopul simplificării procesului fermentativ pentru ridicarea la scară.

S-a demonstrat funcționalitatea și stabilitatea granulelor de chefir prin liofilizare cu soluție 20% (g/v) inulină, ca agent crioprotector.

Au fost concepute diferite scheme bloc pe operații unitare care au vizat îmbogățirea compoziției compușilor postbiotici în produsele fermentate obținute pe bază de făină de năut, quinoa, hrișcă și okara, prin variația tipului și a concentrației de inocul, compoziției substratului de fermentare, tratamentelor preliminare aplicate sau a sistemului de fermentare utilizat, cu impact major asupra îmbunătățirii proprietăților antifungice și antioxidante.

Cele mai bune performanțe fermentative s-au obținut cu cultura liofilizată GKA2, care a avut o capacitate foarte bună de adaptare la condițiile biotehnologice testate

și a fost capabilă să metabolizeze compușii chimici din compoziția substratului de fermentare formulat astfel încât să determine o îmbogățire a compoziției postbiotice (acizi organici, acizi fenolici și flavonoide) în produsul fermentat, pentru obținerea aluatului acid fără gluten cu proprietăți tehnologice și funcționale îmbunătățite. Astfel, alaturile acide fără gluten obținute în acest studiu, prin utilizarea inovativă a culturilor starter artisanale, pot contribui la diversificarea gamei sortimentale a produselor fără gluten cu stabilitate microbiologică extinsă.

Acest studiu oferă perspective inovative pentru identificarea noilor utilizări ale GKA în procese fermentative în care se utilizează substraturi vegetale. Se evidențiază, de asemenea, versatilitatea microorganismelor din consorțiul GKA, fiind așadar facilitată diversificarea gamei unor produse sau ingrediente alimentare și furajere noi, cu funcționalitate ridicată.

Capitolul 5. Testarea funcționalității aluatului acid în produse de panificație neconvenționale

5.1. Introducere

Glutenul este o componentă proteică importantă din majoritatea materiilor prime convenționale folosite pentru obținerea produselor de panificație. Prezența glutenului în pâine aduce beneficii tehnologice și crește acceptabilitatea consumatorilor pentru produsele finite obținute, datorită capacității sale de a dezvolta o rețea stabilă în urma frământării aluatului, proces care favorizează totodată înglobarea aerului și a CO₂ rezultat în urma fermentației (Alizadehbahaabadi și colab., 2021).

În contextul în care un procent din ce în ce mai mare din populație alege să elimine glutenul din dietă, este esențial să se realizeze studii științifice care să vină în sprijinul consumatorilor, astfel încât produsele finite fără gluten să fie caracterizate de un nivel ridicat al calității și funcționalității (Miranda-Ramos și colab., 2020). Diversificarea gamei sortimentale a produselor de panificație fără gluten reprezintă un obiectiv pe care cercetătorii din domeniu îl urmăresc, de cele mai multe ori pentru a satisface exigențele consumatorilor referitoare la calitatea nutritivă a produselor alimentare, dar și pentru a îmbunătăți efectele benefice pentru sănătate determinate de consumul produselor de panificație funcționale (Ibidapo și colab., 2020). În literatura de specialitate sunt prezentate numeroase modalități de obținere a produselor de panificație fără gluten cu funcționalitate ridicată, fermentarea cu tulpini selecționate de bacterii lactice și drojzii sau consorții ale acestora, respectiv suplimentarea cu diverse adaosuri (zer, extracte din coji de ceapă, făinuri de pseudocereale și leguminoase sau țărâțe) fiind unele dintre cele mai comune abordări în vederea atingerii scopului urmărit (Gobbetti și colab., 2019; Ito și Arai, 2021; Roman și colab., 2019).

Majoritatea produselor de panificație fără gluten sunt obținute din făină de orez, însă o serie de studii științifice evidențiază efectele benefice pentru sănătate determinate de consumul produselor de panificație fără gluten obținute din materii

prime neconvenționale precum meiul, quinoa, sorgul, teff-ul, hrișca sau năutul. Impactul pozitiv asupra sănătății se concretizează prin scăderea indicelui glicemic, creșterea conținutului de amidon rezistent și îmbunătățirea digestibilității proteinelor (Chakraborty și colab., 2020; Romão și colab., 2021; Sahagún și colab., 2020). De asemenea, pseudocerealele și leguminoasele sunt caracterizate de un conținut ridicat de proteine, lipide, fibre alimentare, minerale și compuși biologic activi cu proprietăți antiinflamatorii, antivirale, anticancerigene sau antidiabetice, fiind eficiente și în prevenirea și tratamentul bolilor cardiovasculare sau Alzheimer (Brites și colab., 2022).

Fermentațiile controlate ale materiilor prime, cu implicarea consorțiilor artisanale de microorganisme sau cu ajutorul tulpinilor selecționate de bacterii lactice și drojdii pentru a obține aluaturi acide, pot conduce la îmbunătățirea caracteristicilor produselor finite (Bender și Schönlechner, 2020). Se recomandă, de asemenea, utilizarea amestecurilor de făinuri de leguminoase, pseudocereale și cereale pentru o compoziție nutrițională echilibrată, germinarea și înmuierea acestora contribuind la creșterea funcționalității prin activarea enzimelor specifice. Totuși, trebuie acordată atenție ponderii ingredientelor în rețeta de obținere a pâinii deoarece pot fi afectate anumite caracteristici senzoriale (Xu și colab., 2020).

Adaosul de aluat acid în pâine poate determina, pe de o parte o creștere a termenului de valabilitate a produselor de panificație în care se utilizează ca bioingredient datorită compușilor postbiotici, cu efect antimicrobian, biosintetizați de microorganisme, care inhibă dezvoltarea mucegaiurilor. Pe de altă parte, s-a demonstrat că utilizarea acestui tip de ingredient fermentat contribuie la reducerea cantității de sare din rețeta produselor de panificație (Debonne și colab., 2020; Voinea și colab., 2020).

În acest capitol s-a urmărit influența substituției amestecului format din făină fără gluten de năut, quinoa și hrișcă, cu aluaturi acide, în concentrații de 10% sau 25% (g/g), obținute prin fermentare cu tulpini selecționate de bacterii lactice ale genului *Lactobacillus* spp. (Păcularu-Burada și colab., 2020; Păcularu-Burada și colab., 2021), respectiv prin fermentare cu cultură liofilizată din granule de chefir de apă. S-au evaluat proprietățile tehnologice și funcționale precum: stabilitatea microbiologică, aciditatea titrabilă totală și pH-ul, textura, digestibilitatea *in vitro* și eliberarea compușilor biologic activi cât și proprietățile senzoriale ale variantelor experimentale de pâine fără gluten obținute, în scopul recomandării pentru obținerea produselor de panificație aglutenice, neconvenționale, cu potențial ridicat de valorificare la nivel industrial.

5.2. Materiale și metode

Investigațiile asupra produselor de panificație fără gluten au urmărit:

- determinarea pH-ului și a acidității titrabile totale;
- analiza profilului textural;
- evaluarea stabilității microbiologice în condiții de depozitare;
- evaluarea comportamentului compușilor biologic activi în timpul digestiei *in vitro* (determinarea conținutului total de polifenoli prin metoda cu reactiv Folin

Ciocâlteu; determinarea conținutului total de flavonoide prin metoda cu soluție de clorură de aluminiu; determinarea proprietăților antioxidante prin metoda cu DPPH și ABTS; determinarea digestibilității amidonului prin metoda cu reactiv DNS);

- aprecierea caracteristicilor senzoriale specifice folosind o scară de evaluare cu 9 puncte.

5.2.2. Obținerea pâinii fără gluten

Rețetele pentru variantele experimentale ale pâinii fără gluten au fost adaptate având în vedere protocoalele descrise în literatură și numeroase studii preliminare, respectiv instrucțiunile oferite de producător pentru pâinea din premix comercial (Aguiar și colab., 2020; Khemiri și colab., 2020; Sahin și colab., 2020; Santos și colab., 2020; Santos și colab., 2021).

Aluatul acid folosit pentru obținerea probelor experimentale codificate P2 și P3 a fost obținut în urma unui proces de fermentare cu tulpini de bacterii lactice selecționate, așa cum s-a descris anterior (Păcularu-Burada și colab., 2020; Păcularu-Burada și colab., 2021). Aluatul acid folosit pentru probele experimentale codificate P4 și P5 a fost obținut prin fermentație în sistem semisolid utilizând ca inocul pentru fermentare cultura liofilizată din granule de chefir de apă, anterior selecționată (GKA2), obținut în condiții optimizate (Păcularu-Burada și colab., 2022).

Aluaturile pentru pâine au fost realizate prin constituirea unui amestec omogen folosind ingredientele din rețeta de fabricație și o mașină de pâine (Studio Casa, București, România) care a asigurat frământarea și dospirea aluatului obținut. Apoi, aluatul a fost divizat în porții de 60 g și s-a realizat coacerea acestora la o temperatură de 200°C, timp de 60 de minute (Puerta și colab., 2021), folosind un cuptor electric cu ventilație (Albatros, Smart Electro-Distribution, București, România).

5.3. Rezultate și discuții

5.3.1. Proprietățile tehnologice și funcționale ale pâinii cu adaos de aluat acid fără gluten obținut în condiții fermentative neconvenționale

Capacitatea acidifiantă

Probele de pâine fără gluten, cu adaos de aluat acide obținute și utilizate în variantele experimentale descrise anterior, au avut valori ale pH-ului cuprinse între 5,25 și 5,91, rezultatele fiind influențate de gradul de substituție al făinurilor cu aluaturile acide cât și de caracteristicile produselor fermentate, în corelație cu tipul culturii starter folosite în procesul fermentativ (**Figura 5.6**).

Pentru o serie de pâini experimentale fără gluten cu sau fără adaos de aluat acide, pe bază de chia, quinoa și cânepă, s-au determinat valori ale pH-ului între 4,67-5,49, în timp ce valorile TTA au variat între 0,99-2,68 mL soluție 0,10 N NaOH (Jagelaviciute și Cizeikiene, 2021). S-au determinat pentru pâinile studiate valori ale pH-ului cu variații în intervalul 4,70-5,60 și valori ale TTA între 3,00-4,70 în funcție de gradul de substituție și modalitatea de obținere.

Rezultatele obținute în acest studiu pentru aciditatea titrabilă totală (TTA) și pH sunt comparabile cu cele raportate de Martins și colab. (2022). Grupul de cercetători menționat a constatat faptul că substituția făinii de orez cu făina de ghinde nefermentată în proporții variabile (0%, 23%, 35% g/g) determină o scădere a pH-ului de la 6,09 la 5,77. Substituția făinii de orez din rețeta de obținere a pâinii fără gluten cu aluat acid pe bază de făină de ghinde, având în vedere același grad de substituție, a condus la valori ale pH-ului cuprinse între 4,89-4,98.

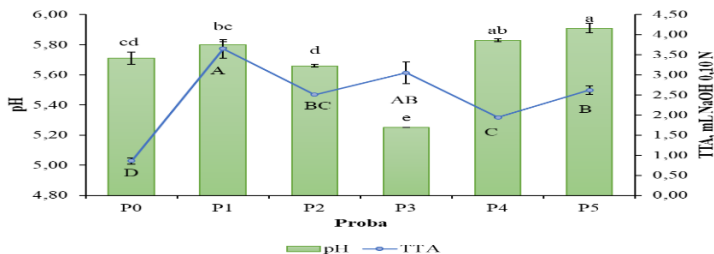


Figura 5.6. Variația pH-ului și a acidității titrabile totale (TTA) pentru probe de pâine fără gluten (valori medii pentru 3 determinări ± deviația standard; literele mici diferite evidențiază diferențele semnificative între valorile pH-ului; literele mari diferite evidențiază diferențele semnificative între valorile TTA)

Analiza profilului textural al pâinii cu aluat acid fără gluten

Cea mai mică valoare a fermității, respectiv 1,30 N (Tabelul 5.2) a fost determinată pentru proba de pâine fără gluten gata de consum achiziționată din comerț (P6), rezultat care poate fi datorat compoziției produsului, bazată în principal pe făină de orez și diferite tipuri de amidon. Proteinele din compoziția făinurilor de năut, quinoa, hrișcă și okara, utilizate la obținerea probelor (P1-P5) au contribuit la dezvoltarea unor structuri mai dense, care au determinat valori mai mari ale fermității, cuprinse în intervalul 1,84-2,33 N. Substituția făinurilor din rețeta de fabricație a pâinii cu adaos de 10% (g/g) aluat acid fermentat cu tulpini selecționate de bacterii lactice (*Lactiplantibacillus plantarum* MIUG BL 21 și *Lactiplantibacillus pentosus* MIUG BL 24) sau cu cultura liofilizată din granule de chefir de apă (GKA2), proba P2 și respectiv proba P4, a determinat valori ale fermității comparabile cu cele obținute pentru proba P6 (pâine fără gluten comercială).

Studiile realizate de alți autori arată că adaosul făinii de năut contribuie, pe de o parte, la creșterea valorilor fermității, în timp ce fermentația lactică determină scăderea valorilor acestui parametru (Guardado-Félix și colab., 2020; Xiao și colab., 2016). Utilizarea drojdiei de panificație și a aluaturilor acide influențează capacitatea de legare a apei și a uleiului, dar și cantitatea de aluat acid folosită și temperatura și durata la care se realizează dospirea aluatului pentru pâine determină modificări ale fermității produsului finit (Caponio și colab., 2022; Najj-Tabasi și colab., 2022).

Tabelul 5.2. Valorile parametrilor texturali analizați pentru produsele de panificație fără gluten

| Cod probă | Caracteristici texturale evaluate | | | |
|-----------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| | Fermitatea, N | Coezivitatea, - | Elasticitatea, mm | Masticabilitatea, mJ |
| P0 | 2,33±0,79 ^a | 0,42±0,05 ^{cd} | 4,03±0,09 ^{ab} | 3,83±1,79 ^a |
| P1 | 2,12±0,39 ^a | 0,52±0,08 ^{ab} | 3,93±0,25 ^{ab} | 4,21±1,34 ^a |
| P2 | 2,07±0,54 ^{ab} | 0,49±0,09 ^{abc} | 4,12±0,10 ^a | 3,98±2,05 ^a |
| P3 | 2,22±0,66 ^a | 0,40±0,08 ^{cd} | 3,44±0,39 ^c | 3,20±1,53 ^a |
| P4 | 1,84±0,60 ^{ab} | 0,46±0,07 ^{bc} | 3,73±0,45 ^{abc} | 3,49±1,60 ^a |
| P5 | 2,33±0,36 ^a | 0,37±0,02 ^d | 3,66±0,30 ^{bc} | 3,06±0,69 ^a |
| P6 | 1,30±0,25 ^b | 0,57±0,04 ^a | 4,06±0,09 ^a | 2,83±0,73 ^a |

Literele diferite într-o coloană evidențiază diferențele semnificative determinate pentru același parametru

Masticabilitatea produselor de panificație este influențată în mare măsură de condițiile în care se realizează dospirea aluatului, respectiv durata și temperatura, în cadrul acestei etape a procesului tehnologic de fabricație au loc reacții enzimatice, modificări ale conținutului de amidon și constituirea rețelei porilor care vor determina proprietățile texturale ulterioare (Naji-Tabasi și colab., 2022).

Liang și colab. (2022) au observat faptul că masticabilitatea scade o dată cu adaosul în pâine a unei cantități mai mari de aluat acid fermentat cu tulpini selecționate de bacterii lactice. Totuși, implicarea diferitelor culturi starter în fermentarea aluatului acid nu a indus modificări semnificative ale masticabilității, concluzie care este în acord cu rezultatele obținute pentru masticabilitatea pâinilor aglutenice din făină de năut, quinoa și hrișcă cu adaos de aluat acide.

Stabilitatea microbiologică a pâinilor fără gluten

Proprietățile antifungice ale probelor de pâine fără gluten obținute au fost îmbunătățite prin substituția făinurilor din compoziție cu aluat acide. Astfel, durata de depozitare a fost extinsă cu 2-4 zile, în funcție de cantitatea de aluat acid adăugată, dar și de tipul culturilor starter folosite pentru obținerea aluatului acid (Figura 5.7).

Rezultatele obținute pot fi comparate cu alte date din literatura de specialitate. Astfel, cele mai performante tulpini de *Lactobacillus plantarum*, care au fost folosite pentru obținerea unui aluat acid și ulterior acesta la fabricarea unei pâini din făină integrală de grâu, au determinat mărirea termenului de depozitare cu 3 zile, în timp ce alte tulpini de *Lactobacillus* spp. incluse în același studiu au determinat accelerarea procesului de mușcărire a pâinii în raport cu proba martor (Sun și colab., 2020).

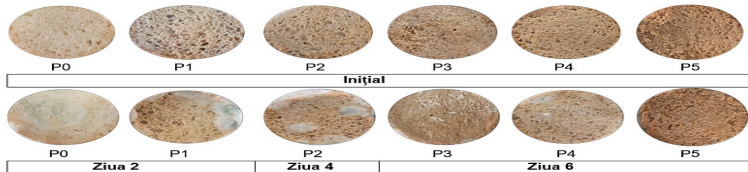


Figura 5.7. Evoluția contaminării fungice a probelor de pâine fără gluten pe durata depozitării la temperatura de 25°C

Combinarea a două aluaturi acide (24% g/g aluat acid total) fermentate cu tulpini de *Lactobacillus amylovorus* sau *Weissella cibaria*, a determinat extinderea termenului de valabilitate al pâinii până la șase zile, moment în care au fost observate primele semne de contaminare (Belz și colab., 2019).

Eliberarea compușilor bioactivi pe durata digestiei in vitro

Conținutul total de polifenoli din probele de pâine fără gluten a fost influențat de ingredientele din rețeta de fabricație. Astfel, la începutul protocolului de digestie *in vitro* (faza orală, t_0) pentru proba P0, obținută din premix comercial pentru pâine fără gluten, s-a determinat un conținut total de polifenoli de 136,95 mg EAG/100 g substanță uscată, în timp ce pentru proba obținută cu amestecul de făinuri aglutenice de năut, quinoa și hrișcă, a fost calculat un conținut total de polifenoli de 177,15 mg EAG/100 g substanță uscată. S-a observat faptul că substituția făinurilor din rețetele de fabricație ale pâinilor cu aluaturi acide fermentate cu tulpini selecționate de bacterii lactice a determinat o scădere a concentrațiilor de polifenoli totali, respectiv 100,77 mg EAG/100 g substanță uscată, pentru proba P2 și 106,62 mg EAG/100 g substanță uscată, pentru proba P3. Un comportament diferit a fost observat în cazul substituției făinurilor aglutenice cu aluaturi acide fermentate în sistem semisolid (SSF) cu cultura starter liofilizată din granule de chefir de apă (GKA2), un grad de substituție de 25% (g/g), în proba P5, a determinat o îmbogățire a conținutului total de polifenoli (314,98 mg EAG/100 g substanță uscată). Fermentația lactică a tărâtelor de grâu cu tulpini selecționate de *Enterococcus faecalis* a determinat creșterea conținutului total de polifenoli, fiind determinată o valoare de 153 mg EAG/100g substanță uscată (Mao și colab., 2020).

Combinarea dintre anumite tulpini de bacterii lactice (*Pediococcus* spp.) și drojdia de panificație (*Saccharomyces cerevisiae*) a determinat creșterea concentrațiilor de polifenoli, în particular a flavonoidelor, atunci când s-a obținut un aluat acid și pâine fără gluten din făină de sorg, fermentația în co-cultură îmbunătățind proprietățile funcționale (Olojede și colab., 2020a). Wang și colab. (2019) au constatat, de asemenea, faptul că fermentația aluatului pâinii cu tulpini selecționate de drojdie poate determina creșterea conținutului total de polifenoli. Impactul adaosului de aluat acid și al timpului de fermentare al acestuia asupra anumitor proprietăți funcționale a fost studiat de către Caponio și colab., 2022. Autorii menționați au determinat un conținut total de polifenoli cu variații între 15,60-99,80 mg EAG/100 g pentru produsele de panificație fără gluten obținute, aceste rezultate fiind în acord cu datele experimentale raportate în acest capitol al tezei de doctorat. A fost observată o eliberare majoritară a flavonoidelor din probele de pâine fără gluten analizate, la nivelul cavității bucale, în salivă simulată, după 2 minute de digestie simulată *in vitro*. Acest rezultat poate fi influențat de complexe formate între flavonoide și amidon, care în prezența α -amilazei se destabilizează și astfel determină creșterea concentrațiilor totale de flavonoide.

Se evidențiază astfel efectul benefic al culturilor starter selecționate, folosite pentru obținerea aluaturilor acide, asupra conținutului total de flavonoide. Funcționalitatea flavonoidelor depinde de tipul culturii starter implicate în

bioprocesul de obținere al aluatului acid, respectiv de concentrația de aluat acid folosită pentru realizarea pâinii fără gluten.

Liang și colab. (2022) au observat, de asemenea, un nivel diferit al conținutului de flavonoide totale, în funcție de cultura starter de bacterii lactice folosită pentru obținerea aluaturilor acide și ulterior a pâinii cu aluat acid (30% g/g). Valorile calculate au variat între 24,40-27,80 mg echivalenți rutină/100 g, fiind comparabile cu datele experimentale obținute în această teză de doctorat. Temperatura de fermentare a aluatului acid influențează totodată conținutul total de flavonoide (Yakubu și colab., 2022).

Evaluarea comparativă a activității antioxidante, atât prin metoda cu DPPH cât și prin metoda cu ABTS, a evidențiat diferențe în aprecierea capacității de neutralizare a celor doi radicali liberi analizați. Totuși, la începutul protocolului de digestie simulată *in vitro*, proba P0, realizată din premix comercial de făină pentru pâine fără gluten, a fost caracterizată de o valoare a activității antioxidante (DPPH) de 12,55 mM ET/100 g substanță uscată, iar după digestia gastro-intestinală a fost determinată o valoare mai mică, respectiv 4,70 mM ET/100 g substanță uscată. De asemenea, pentru proba P5, realizată cu adaos de 25% (g/g) aluat acid obținut în aceleași condiții fermentative, s-a observat o reducere a activității antioxidante prin metoda cu DPPH, de la 4,01 la 2,26 mM ET/100 g substanță uscată. Substituția făinurilor aglutenice din rețetă cu 10% (g/g) aluat acid, obținut prin fermentare cu tulpini selecționate de bacterii lactice (proba P2) a influențat pozitiv activitatea antioxidantă (DPPH), la finalul protocolului de digestie simulată fiind calculată o concentrație de 5,20 mM ET/100 g substanță uscată.

Pe de altă parte, pentru probele de pâine fără gluten P0-P3 nu au putut fi determinate rezultate ale activității antioxidante prin metoda cu ABTS după digestia simulată *in vitro*, la nivelul cavității bucale sau după digestia gastrică. Proba martor obținută din amestecul de făinuri de năut, quinoa și hrișcă (P1) a determinat eliberarea compușilor cu activitate inhibitorie asupra ABTS, după 80 de minute de digestie intestinală, fiind calculată o valoare maximă de 4,35 mM ET/100 g substanță uscată, în timp ce, după același interval de timp a fost determinată o valoare maximă (1,75 mM ET/100 g substanță uscată) a activității antioxidante (ABTS), pentru proba P2, cu adaos de 10% (g/g) aluat acid obținut prin fermentare cu tulpini de bacterii lactice selecționate. Un procent de substituție mai mare al făinurilor aglutenice cu același tip de aluat acid, respectiv 25% (g/g), a determinat valori mai mari ale activității antioxidante (ABTS), respectiv 2,90 mM ET/100 g substanță uscată, după 120 de minute de digestie gastro-intestinală simulată.

Datele experimentale raportate de alți cercetători în ceea ce privește activitatea antioxidantă, prin metoda cu DPPH, arată că, caracteristicile compoziționale ale probei analizate influențează rezultatele obținute. Astfel, pentru o pâine pe bază de făină de secară s-a determinat o concentrație de 0,30 mM ET/100 g substanță uscată (Lachowicz și colab., 2020). În alte studii științifice se evidențiază importanța duratei de fermentare și a tulpinilor din compoziția culturilor starter folosite asupra capacității de neutralizare a radicalului liber DPPH (Colosimo și colab., 2020; Liang și colab., 2022). Adaosul unei pudre obținute din frunze de broccoli în rețeta de

fabricație a unei pâini fără gluten a îmbunătățit activitatea antioxidantă de la 27 la 95 μM ET/100 g (Krupa-Kozak și colab., 2021), rezultatele raportate fiind mult mai mici decât cele obținute în studiul experimental realizat și prezentat în acest capitol al tezei de doctorat.

Digestibilitatea *in vitro* a amidonului

Identificarea diferitelor fracțiuni ale amidonului, respectiv amidon rapid digerabil, greu digerabil și rezistent, cât și modificările apărute la nivel cantitativ o dată cu substituția făinurilor aglutenice cu diferite concentrații și tipuri de aluaturi acide a reprezentat un obiectiv de interes în vederea intensificării caracterului funcțional al produselor de panificație fără gluten obținute. Astfel, pe baza informațiilor prezentate în **Tablelul 5.7**, se pot observa diferențele în ceea ce privește ponderea fracțiunilor de amidon din probele analizate.

Studiul realizat de Bottani și colab. (2018) evidențiază capacitatea anumitor tulpini de bacterii lactice selecționate aparținând genului *Leuconostoc* spp. și *Lactobacillus* spp., de a mări conținutul de amidon rezistent din pâine, valori mai mici de 10% au fost determinate pentru această fracțiune. Materiile prime folosite la obținerea pâinii influențează în mod direct conținutul de amidon ușor digerabil, rezistent sau rapid digerabil (Di Cairano și colab., 2020), altelei ponderea fracțiunilor de amidon poate fi modificată ca rezultat al diverselor tratamente aplicate, respectiv germinare combinată cu ultrasonare sau tratament termic și fermentare, așa cum se arată în studiile realizate de You și colab. (2016) și Lu și colab. (2018). Amidonul rezistent determinat pentru un produs de panificație pe bază de făină de grâu cu adaos de făină de cartof mov a variat în intervalul 34,90-42,90% în funcție de cantitatea de făină adăugată în aluatul pentru pâine (Liu și colab., 2019).

Tablelul 5.7. Fracțiunile de amidon din probele de pâine fără gluten rezultate în urma digestiei simulate *in vitro*

| Proba | Fracțiune de amidon ¹ , % | | |
|-------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Amidon rapid digerabil | Amidon greu digerabil | Amidon rezistent |
| P0 | 15,37±0,12 ^c | 52,70±0,32 ^d | 31,93±0,39 ^{bA} |
| P1 | 23,23±1,24 ^{bA} | 69,62±1,43 ^{aA} | 7,15±0,21 ^e |
| P2 | 17,73±0,23 ^b | 52,50±0,16 ^d | 29,77±0,39 ^{bA} |
| P3 | 22,67±0,11 ^{bA} | 66,63±1,71 ^{aB} | 10,69±1,81 ^{cD} |
| P4 | 19,61 ±0,99 ^{bB} | 61,00±0,79 ^c | 19,39±0,22 ^{bC} |
| P5 | 18,12±0,63 ^b | 54,35±0,33 ^d | 27,53±0,52 ^{bB} |

¹Valori medii pentru 3 determinări ± deviația standard. Literele mici diferite denotă diferențele semnificative pe rând iar literele mari diferite denotă diferențele semnificative pe coloană

5.3.2. Proprietățile senzoriale ale pâinilor fără gluten cu adaos de aluat acid

Probele experimentale de pâine fără gluten au fost evaluate senzorial de un grup de paneliști nespecializați, mediile punctajelor oferite de aceștia pentru fiecare atribut analizat fiind prezentate în **Figura 5.8**.

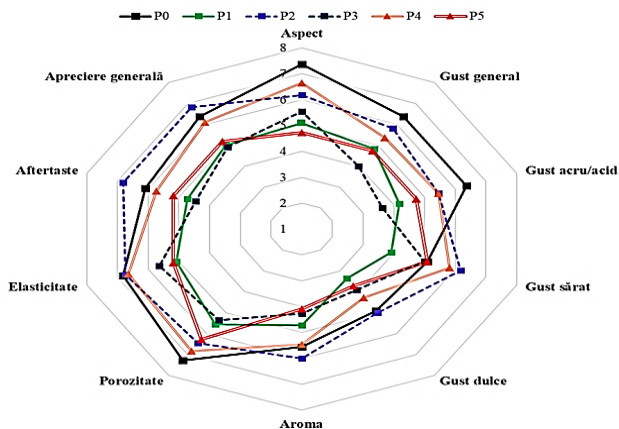


Figura 5.8. Valori medii ale caracteristicilor senzoriale evaluate pentru produsele de panificație fără gluten

Într-o manieră similară au fost obținute probe de pâine fără gluten cu quinoa ca atare, quinoa germinată sau cu aluat acid pe bază de quinoa. Analiza senzorială a produselor finite a evidențiat preferința degustătorilor pentru pâinea fără gluten cu aluat acid pe bază de quinoa. Cele mai mari punctaje au fost acordate pentru aromă, elasticitate și gustul acid, iar cele mai mici punctaje au fost atribuite pentru gustul sărat și cel fermentat (Franco și colab., 2021).

Rezultatele experimentale obținute pentru analiza senzorială, raportate în acest capitol, sunt confirmate și de studiul realizat de Yeşil și Levent (2022), care au concluzionat că făinurile de pseudocereale (amarant, hrișcă, quinoa) folosite în rețetele de fabricație ale pâinii fără gluten și microorganismele implicate în fermentație (microbiota spontană sau drojdia de panificație) influențează în mare măsură caracteristicile texturale și senzoriale ale produselor finite.

5.4. Concluzii parțiale

S-a studiat impactul adaosului, în proporție de 10% și 25% (g/g), de aluat acid obținut cu diferite culturi starter în vederea obținerii unor produse de panificație fără gluten neconvenționale, pe bază de făinuri de năut, quinoa și hrișcă. Efectele asupra proprietăților funcționale, texturale și senzoriale au fost studiate comparativ cu probe martor obținute din făinuri aglutenice comerciale sau făinuri de năut, quinoa și hrișcă fără adaos de aluat acid.

Rezultatele obținute evidențiază îmbunătățirea stabilității microbiologice în condiții de depozitare, printr-o extindere a termenului de valabilitate cu două până la patru zile, în funcție de cultura starter folosită pentru obținerea aluatului acid și cantitatea de făină substituită. Creșterea stabilității microbiologice a produselor, prin prelungirea termenului necesar dezvoltării mucegaiurilor contaminante, este

asociată cu prezența în compoziția aluatului acid a compușilor postbiotici cu potențial antifungic.

Evaluarea profilului textural al probelor de pâine obținute, prin comparație cu o altă probă de pâine fără gluten comercială gata de consum (P6), a evidențiat modificările anumitor caracteristici texturale precum fermitatea, coezivitatea și elasticitatea, determinate de substituția făinurilor aglutenice cu alaturile acide.

În urma analizei digestibilității simulate *in vitro* a variantelor experimentale de pâine fără gluten (P0-P5) s-a observat un comportament diferit al amidonului și al compușilor biologic activi cu proprietăți antioxidante, acesta fiind influențat atât de ingredientele din rețeta de fabricație cât și de culturile starter folosite în procesele fermentative de obținere ale alaturilor acide. Amestecul făinurilor de năut, quinoa și hrișcă a determinat o îmbunătățire a conținutului compușilor polifenolici, inclusiv flavonoide, iar adaosul alaturilor acide a contribuit la o eliberare controlată, în urma digestiei simulate, a acestor compuși bioactivi cu activitate antioxidantă. Rezultatele obținute în urma digestiei simulate *in vitro* sunt influențate de gradul de substituție al făinurilor aglutenice cu alaturile acide, utilizarea aluatului acid obținut prin fermentație cu cultură starter din granule de chefir de apă contribuind la o eliberare îmbunătățită a compușilor funcționali din produsele de panificație obținute.

Studiile realizate au caracter inovativ și deschid noi perspective de valorificare a materiilor prime aglutenice în scopul obținerii unor produse de panificație neconvenționale cu funcționalitate îmbunătățită. Pe baza criteriilor de calitate a produselor de panificație obținute, având în vedere proprietățile funcționale și senzoriale, cât și pentru extinderea pe scară largă a fabricării produselor de panificație aglutenice pe bază de năut, quinoa și hrișcă, cu adaos de 10% (g/g) aluat acid obținut prin fermentații în condiții controlate, optimizate, se consideră procese de perspectivă cu potențial de ridicare la scară în condiții de eficiență economică, promovând alimentația sănătoasă și creșterea calității vieții.

Capitolul 6. Concluzii generale

Teza de doctorat a vizat studiul unor variante biotehnologice eficiente de obținere a alaturilor acide prin fermentarea unor făinuri aglutenice din năut, quinoa și hrișcă, folosind culturi starter selecționate, inclusiv consorții de microorganisme din culturi artisanale (granule de chefir de apă și lapte), în vederea obținerii unor bioingrediente cu proprietăți tehnologice și funcționale îmbunătățite pentru utilizări în panificație. Având în vedere rezultatele experimentale prezentate și concluziile parțiale detaliate la finalul fiecărui capitol, pot fi sistematizate următoarele concluzii generale:

- Este acordată o atenție deosebită modalităților de obținere ale alaturilor acide cu aplicații în panificație, în scopul înțelegerii, perfecționării și optimizării proceselor biotehnologice implicate, ținând cont de materiile prime neconvenționale disponibile care pot fi valorificate sustenabil prin exploatarea potențialului metabolic al unor microorganisme performante, pentru creșterea valorii nutritive și îmbunătățirea

proprietăților tehnologice și funcționale ale produselor fermentate obținute, bioingrediente valoroase pentru utilizări multiple, extinse în producerea altor alimente, nutraceutice sau furaje.

- Specialiștii din cercetare și producție urmăresc permanent diversificarea gamei sortimentale a produselor de panificație obținute prin tehnologii „curate”, pentru consumul larg sau destinate consumatorilor cu diete alimentare personalizate (dietă fără gluten sau fără lactoză, dietă vegană/ vegetariană, dietă hiperproteică). Aceste produse alimentare noi trebuie să fie caracterizate de proprietăți nutriționale, senzoriale și funcționale îmbunătățite, în care să se limiteze adaosul de aditivi și ingrediente pentru a asigura conservabilitatea și siguranța alimentară.

- Având în vedere diversitatea metabolică și adaptabilitatea funcțională deosebită a bacteriilor lactice, au fost izolate și studiate preliminar un număr de 60 de tulpini de bacterii lactice cu origini diferite, selecția acestora realizându-se pe baza unor criterii de performanță metabolică și de relevanță statistică și anume: proprietățile acidifiante, proprietățile antimicrobiene împotriva tulpinilor de mucegaiuri și bacterii sporulate (microorganisme de alterare și cu risc pentru siguranța alimentară în produsele de panificație), capacitatea de biosinteză a unor enzime extracelulare cu impact în panificație și a exopolizaharidelor, în vederea utilizării lor ulterioare în procesul de fermentare pentru obținerea aluatului acid fără gluten. Au fost selecționate patru tulpini performante, care au fost codificate MIUG BL 21, MIUG BL 24, MIUG BL 38, tulpini aparținând genului *Lactobacillus* spp. și MIUG BL 40, aparținând genului *Leuconostoc* spp. Aceste tulpini se află în gestiunea Colecției de microorganisme a platformei Bioaliment (indicativ MIUG) (<https://www.unicer.ugal.ro/index.php/ro/uc-acreditate-institutional>), colecție afiliată la infrastructura de cercetare pan-europeană *The Microbial Resource Research Infrastructure* (MIRRI) (<https://www.mirri.org/>).

- S-au studiat proprietățile probiotice ale tulpinilor selecționate și s-a stabilit că tulpina MIUG BL 21 prezintă potențial probiotic îmbunătățit, determinat de supraviețuirea celulelor la cultivare în mediul cu pH scăzut sau cu adaos de săruri biliare. De asemenea, această tulpină a fost caracterizată de rezistență la un spectru larg de antibiotice, supraviețuire după digestia gastro-intestinală simulată *in vitro*, efect antipatogen și anticancerigen.

- Trei dintre tulpinile performante au fost identificate filogenetic și au fost clasificate taxonomic ca aparținând speciilor *Lactiplantibacillus plantarum* (MIUG BL 21), *Lactiplantibacillus pentosus* (MIUG BL 24) și *Lacticaseibacillus rhamnosus* (MIUG BL 38).

- S-a evaluat capacitatea tulpinilor *Lactobacillus* spp. (MIUG BL 39) și *Leuconostoc* spp. (MIUG BL 40) de a biosintetiza exopolizaharide și s-a evidențiat influența inoculului folosit și a tehnicilor de extracție asupra randamentului exopolizaharidelor separate, respectiv asupra proprietăților antioxidante ale acestor compuși biopolimerici.

- S-a formulat și optimizat compoziția mediului fermentativ pe bază de făinuri aglutenice de năut, quinoa, hrișcă și okara și condițiile fermentative de obținere a aluatului acid utilizând tehnicile de planificare experimentală, modelare matematică

și analiză statistică Plackett-Burman (PBD) și metoda analizei suprafeței de răspuns (RSM). Tulpinile de bacterii lactice selecționate implicate în procesele fermentative, *Lactiplantibacillus plantarum* MIUG BL 21 și *Lactiplantibacillus pentosus* MIUG BL 24, au demonstrat performanțele metabolice și au contribuit la îmbunătățirea compoziției în compuși bioactivi (acizi organici și polifenoli) a produselor fermentate obținute. Proprietățile tehnologice sau funcționale ale aluatului acid obținut pot fi controlate stabilind, pentru fiecare răspuns vizat, parametrii (variabilele independente) relevanți, efectul intercorelat al acestora și valorile numerice care conduc la procedee optimizate, particularizate în funcție de scopul vizat, respectiv intensificarea activității antimicrobiene (antifungice, antibacteriene) sau a activității antioxidante.

- S-a demonstrat că postbioticele, metaboliții rezultați prin bioprosesare sau eliberați din celulele microorganismelor implicate în calitate de culturi starter, îmbunătățesc proprietățile tehnologice și funcționale ale aluatului acid fără gluten obținut, fiind recomandat ca un bioingredient valoros cu utilizări multiple pentru producerea de alimente, nutraceutice, furaje etc., cu impact asupra calității vieții.

- În formularea substratului de fermentare s-a avut în vedere valorificarea subprodusului numit okara rezultat sub formă de borhot de la prelucrarea boabelor de soia, care s-a dovedit un ingredient valoros din punct de vedere nutritiv pentru bacteriile lactice și, de asemenea, un promotor pentru producerea de compuși bioactivi prin fermentații și procese de bioconversie.

- S-a studiat posibilitatea utilizării culturilor artisanale formate din consorții de bacterii lactice, bacterii acetice și drojdii, care alcătuiesc microbiota granulelor de chefir de apă sau de lapte, în calitate de culturi starter pentru fermentarea substraturilor formate din făinuri aglutenice din năut, quinoa, hrișcă și okara pentru obținerea aluatului acid. Pentru stabilizare și simplificarea utilizării în calitate de inocul, granulele de chefir s-au liofilizat în soluție 20% (g/v) inulină ca agent crioprotector.

- Au fost concepute mai multe variante tehnologice (scheme bloc pe operații unitare) pentru obținerea aluatului acid, variind tipul și dimensiunea inoculului, fermentarea în șarje succesive conduse în sisteme de fermentare în mediu lichid (LSF) sau semisolid (SSF), fiind evidențiat și impactul tratamentelor preliminară ale substratului fermentativ asupra proprietăților tehnologice și funcționale ale produsului fermentat.

- Studiul comparativ al culturilor artisanale, prin cultivare pe substraturile neconvenționale a permis identificarea noilor posibilități de utilizare a granulelor de chefir de apă performante pentru obținerea aluatului acid fără gluten pe bază de năut, quinoa, hrișcă și okara. Complexitatea microbiotei acestor consorții de microorganisme naturale, din punctul de vedere al componenței microbiologice (tipul și raportul dintre microorganisme) și funcționalitatea metabolică (proprietățile biochimice și fiziologice), este dependentă de proveniența acestor culturi care influențează totodată adaptabilitatea și funcționalitatea în condiții fermentative particulare. Implicarea consorțiilor de microorganisme care funcționează sinergic,

în simbioză, în bioprocese performante, aduce multiple beneficii asupra proprietăților bioactive ale aluaturilor acide obținute.

- Substituția amestecului de făinuri aglutenice de năut, quinoa și hrișcă cu aluaturile acide obținute cu cultura starter liofilizată din granule de chefir de apă, în proporții variabile (10% și 25% g/g), a determinat modificări benefice ale proprietăților tehnologice și funcționale ale produselor de panificație fără gluten în care produsul fermentat a fost folosit ca bioingredient. Aceste proprietăți au fost demonstrate prin studii de digestie simulată *in vitro*, pentru toate etapele din tractul gastro-intestinal.

- În funcție de gradul de substituție s-a observat o extindere a termenului de valabilitate, fiind determinate totodată modificări benefice ale unor caracteristici texturale și o eliberare controlată a compușilor funcționali respectiv flavonoide, acizi fenolici și alți compuși cu activitate antioxidantă, precum și amidon rezistent cu efect prebiotic. Prin analiza senzorială însă, consumatorii au preferat produsele în care făinurile aglutenice s-au substituit cu 10% (g/g) aluat acid.

- Soluțiile propuse contribuie la diversificarea gamei sortimentale a produselor de panificație, cu posibilitatea de ridicare la scară a proceselor pe principii de eficiență economică și de calitate a produselor finite, promovând totodată conceptul de etichetă „curată”.

- Rezultatele obținute subliniază caracterul inovativ al conceptelor studiate și demonstrate în teza de doctorat din punct de vedere științific și aplicativ, în acord deplin cu obiectivele științifice vizate, sporesc nivelul cunoașterii în domeniu și totodată deschid noi perspective pentru înțelegerea și perfecționarea proceselor biotehnologice cu aplicații în producerea aluatului acid, cu impact pozitiv asupra calității vieții, prin valorificarea superioară a resurselor și prin aplicarea principiilor economiei circulare.

Capitolul 7. Contribuții originale și perspective de continuare a cercetărilor

Contribuțiile originale ale tezei de doctorat derivă din următoarele aspecte:

- Au fost izolate și analizate din punct de vedere morfologic și metabolic un număr mare de tulpini de bacterii lactice (60 de tulpini) din microbiota specifică a unor făinuri de cereale, leguminoase, pseudocereale, respectiv a produselor lactate fermentate sau a altor ecosisteme naturale. Pentru selecția tulpinilor performante pe baza proprietăților biotehnologice și funcționale specifice, s-au analizat simultan mai multe variabile metabolice prin analiza componentelor principale (*engl. Principal Component Analysis*). Un număr de 4 tulpini, aparținând genurilor *Lactobacillus* spp. (*Lactiplantibacillus plantarum* MIUG BL 21, *Lactiplantibacillus pentosus* MIUG BL 24, *Lactocaseibacillus rhamnosus* MIUG BL 38) și *Leuconostoc* spp. (*Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides* MIUG BL 40) au fost selecționate și sunt păstrate în Colecția de microorganisme MIUG, cu relevanță națională și internațională.

▪ S-a propus utilizarea ca substraturi fermentative pentru producerea aluatului acid a făinurilor aglutenice de leguminoase (năut), pseudocereale (quinoa și hrișcă) și a făinii obținute prin liofilizarea unui subprodus rezultat din industria laptelui de soia (okara), aceste materii prime nefiind exploatate suficient în procese biotehnologice cu obținerea produselor fermentate cu valoare adăugată.

▪ S-au propus scheme pe operații unitare noi pentru biotehnologia de obținere a aluatului acid, pe criterii de eficiență metabolică și fiziologică a culturilor starter utilizate, corelate cu proprietățile tehnologice și funcționale ale produselor fermentate obținute, precum și pentru simplificarea proceselor și eficiența economică în scopul utilizării pe scară largă în practică.

▪ S-a demonstrat eficiența culturilor artisanale, respectiv granule de chefir de apă, pentru utilizarea în calitate de culturi starter multiple în fermentarea substratului formulat pe bază de făinuri aglutenice (năut, quinoa și hrișcă) și okara, cu numeroase beneficii asupra proprietăților bioactive ale produsului fermentat, recomandat ca bioingredient valoros cu efect antimicrobian și antioxidant. Aceste studii realizate în premieră se vor constitui într-o cerere de brevet de invenție.

▪ Stabilirea unei rețete de fabricație a pâinii fără gluten pe bază de năut, quinoa și hrișcă și studiul impactului aluaturilor acide, obținute prin fermentație cu culturi de bacterii lactice selecționate și culturi artisanale (granule de chefir), asupra funcționalității produselor finite prin prisma comportamentului compușilor biologici activi țintă în urma digestiei *in vitro* sunt, de asemenea, argumente care susțin originalitatea tezei de doctorat. Pe baza competențelor dobândite pe durata studiilor doctorale, având în vedere evoluția științifică din domeniul studiat, perspectivele de continuare a cercetărilor se vor axa pe biovalorificarea sustenabilă a materiilor prime și subproduselor disponibile dar insuficient exploatate, studiul microorganismelor probiotice (bacterii lactice și drojdii) și coordonarea eficientă a acestora pentru obținerea de metabiotice (prebiotice, probiotice, postbiotice și paraprobiotice).

Capitolul 8. Diseminarea rezultatelor

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

A. Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Ceoromila (Cantaragiu), Alina-Mihaela, Vasile, Mihaela Aida, Bahrim, Gabriela-Elena, 2022. *Novel insights into different kefir grains usefulness as valuable multiple starter cultures to achieve bioactive gluten-free sourdoughs*. LWT – Food Science and Technology, 165, 113670. **Factor de impact: 4,952.**

2. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Turturică, Mihaela, Rocha, João Miguel, Bahrim, Gabriela-Elena, 2021. *Statistical Approach to Potentially Enhance the Postbiotication of Gluten-Free Sourdough*. Applied Sciences, 11(11), 5306. **Factor de impact: 2,679.**
3. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Georgescu, Luminița Anca, Vasile, Mihaela Aida, Rocha, João Miguel, Bahrim, Gabriela-Elena, 2020. *Selection of wild lactic acid bacteria strains as promoters of postbiotics in gluten-free sourdoughs*. Microorganisms, 8(5), 643. **Factor de impact: 4,167.**

B. Articole publicate în reviste indexate în baze de date internaționale

1. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Bahrim, Gabriela-Elena, 2021. *Extraction and antioxidant activity assessment of postbiotic exopolysaccharides produced by selected lactic acid bacteria*. Innovative Romanian Food Biotechnology, 20 (revistă indexată în baze de date internaționale, <https://www.gup.ugal.ro/ugaljournals/index.php/IFRB/about>).
2. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Georgescu, Luminița Anca, Bahrim, Gabriela-Elena, 2020. *Current approaches in sourdough production with valuable characteristics for technological and functional applications*. The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI – Food Technology, 44(1), 132-148 (revistă indexată Web of Science Core Collection, Clarivate Analytics Master Journal List, Emerging Sources Citation Index).

C. Capitole de carte

1. Constantin, Oana Emilia, **Păcularu-Burada, Bogdan**, Bahrim, Gabriela-Elena, 2022. Yeast strains from sourdough as potential clean-label starters for fermentation processes. In: Ceresino, Elaine, Juodeikiene, Grazina, Miescher, Susanne, Rocha, João Miguel (Eds.) *Sourdough microbiota and starter cultures for industry*. Gewerbestrasse, Switzerland: Springer Nature – acceptat pentru publicare.
2. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Pihurov, Marina, Cotârleț, Mihaela, Enachi, Elena, Bahrim, Gabriela-Elena, 2022. Introduction to sourdough enzymology. In: Vaquero, Marco Garcia, Rocha, João Miguel (Eds.) *Sourdough Innovations: Novel Uses of Metabolites, Enzymes and Microbiota from Sourdough Processing*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press – acceptat pentru publicare.

D. Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale

1. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Bahrim, Gabriela-Elena, Vasile, Mihaela Aida, 2022. *New Strategy to Develop Metabiotic Sourdoughs for Gluten-Free Bread Functionalization*, 8th World Congress on New Technologies – NewTech'22, 03-05 august 2022, Praga, Cehia.

2. Pihurov, Marina, **Păcularu-Burada, Bogdan**, Cotârleț, Mihaela, Grigore-Gurgu, Leontina, Bahrim, Gabriela-Elena, 2022. *Study of newly lactobacilli strains to be used as delivery systems for probiotics*, Congress on food quality and safety, health and nutrition – NUTRICON 2022, 08-10 iunie 2022, Ohrid, Macedonia.
3. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Vasile, Mihaela Aida, Cotârleț, Mihaela, Pihurov, Marina, Bahrim, Gabriela-Elena, 2021. *Study on the newly lactic acid bacteria strains for their probiotic behaviour*, 10th Edition of Euroaliment Symposium, 07-08 octombrie 2021, Galați, România.
4. Pihurov, Marina, **Păcularu-Burada, Bogdan**, Vasile, Mihaela Aida, Cotârleț, Mihaela, Bahrim, Gabriela-Elena, 2021. *Increasing the usage of agro-food byproducts through Lactobacillus spp. fermentation by using the Plackett-Burman Design*, 10th Edition of Euroaliment Symposium, 07-08 octombrie 2021, Galați, România.
5. Vasile, Mihaela Aida, **Păcularu-Burada, Bogdan**, Pihurov, Marina, Cotârleț, Mihaela, Bahrim, Gabriela-Elena, 2021. *Biotechnological parameters with impact on bovine colostrum tribiotication by fermentation with selected lactic acid bacteria*, 10th Edition of Euroaliment Symposium, 07-08 octombrie 2021, Galați, România.
6. Bahrim, Gabriela-Elena, Pihurov, Marina, **Păcularu-Burada, Bogdan**, Râpeanu, Gabriela, Stănciuc, Nicoleta, 2021. *Biotics+: From concepts to applications for generation of innovative tailored functional food*, 10th Edition of Euroaliment Symposium, 07-08 octombrie 2021, Galați, România.
7. Pihurov, Marina, **Păcularu-Burada, Bogdan**, Vasile, Mihaela Aida, Cotârleț, Mihaela, Bahrim, Gabriela-Elena, 2021. *Lactic acid bacteria isolated from the artisanal cultures as postbiotics promoters by fermentation of unconventional substrates*, 11th Edition of Probiotics, Prebiotics & New Foods, Nutraceuticals & Botanicals for Nutrition & Human and Microbiota Health, 12-14 septembrie 2021, Roma, Italia.
8. Vasile, Mihaela Aida, **Păcularu-Burada, Bogdan**, Pihurov, Marina, Cotârleț, Mihaela, Bahrim, Gabriela-Elena, 2021. *Postbiotic composition of the bovine colostrum improved by lactic acid fermentation in optimized conditions*, 11th Edition of Probiotics, Prebiotics & New Foods, Nutraceuticals & Botanicals for Nutrition & Human and Microbiota Health, 12-14 septembrie 2021, Roma, Italia.
9. Cotârleț, Mihaela, Pihurov, Marina, **Păcularu-Burada, Bogdan**, Vasile, Mihaela Aida, Bahrim, Gabriela-Elena, 2021. *Enhancement of the postbiotics production by lactic acid bacteria on agri-food residual substrates*, 11th Edition of Probiotics, Prebiotics & New Foods, Nutraceuticals & Botanicals for Nutrition & Human and Microbiota Health, 12-14 septembrie 2021, Roma, Italia.

10. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Georgescu, Luminița Anca, Bahrim, Gabriela-Elena, 2020. *Postbiotic Exopolysaccharides Biosynthesized by Selected Lactic Acid Bacteria Strains for Gluten-Free Sourdough*, European Biotechnology Congress 2020, 24-26 septembrie 2020, Praga, Cehia.
11. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Cotârlet, Mihaela, Vasile, Mihaela Aida, Bahrim, Gabriela-Elena, 2019. *Assessment of lactic acid bacteria enzymatic activities on chromogenic substrates for the functional food products obtainment*, Modern Biotechnological Advances for Human Health – BAHH, 28-31 mai 2019, București, România.

E. Lucrări comunicate la manifestări științifice naționale

1. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Bahrim, Gabriela-Elena, 2022. *Effects of gluten-free breads supplementation with sourdoughs involving unconventional starters*, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ - Galați CSSD-UDJG 2022, 9-10 iunie, Galați, România.
2. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Bahrim, Gabriela-Elena, 2021. *Selection of lactic acid bacteria strains with probiotic characteristics*, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ - Galați CSSD-UDJG 2021, 10-11 iunie, Galați, România.
3. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Bahrim, Gabriela-Elena, 2021. *Postbiotic Exopolysaccharides Obtained by Controlled Fermentation Processes with Selected Lactic Acid Bacteria: Extraction and Characterization*, Conferința pentru Integrare Europeană – Realități și perspective, Ediția a-XVI-a – Universitatea Danubius din Galați, 2021, 14-15 mai, Galați, România.
4. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Bahrim, Gabriela-Elena, 2021. *Sourdough – a Functional Remedy in COVID-19 Pandemic Context*, Conferința pentru Integrare Europeană – Realități și perspective, Ediția a-XVI-a – Universitatea Danubius din Galați, 2021, 14-15 mai, Galați, România.
5. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Georgescu, Luminița Anca, Bahrim, Gabriela-Elena, 2020. *Exopolysaccharides biosynthesized by newly lactic acid bacteria strains with impact on gluten-free sourdough biotechnology*, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ - Galați CSSD-UDJG 2020, 18-19 iunie, Galați, România.
6. **Păcularu-Burada, Bogdan**, Georgescu, Luminița Anca, Bahrim, Gabriela-Elena, 2019. *Sourdough Formulation with Improved Antimicrobial Properties*, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ - Galați CSSD-UDJG 2019, 13-14 iunie, Galați, România.