

Stadiul si rezultatele obtinute in Etapa IV/2019

Optimizarea si testarea viabilitatii probioticelor microincapsulate in conditii gastrointestinale simulate (ICECHIM)

Avand in vedere rezultatele testarii preliminare a viabilitatii probioticelor microincapsulate in matrice de alginat de sodiu la actiunea simulantilor gastrointestinali, obiectivul urmarit a fost optimizarea parametrilor de testare. Parametrii selectionati au fost cei implicati in formularea microcapsulelor, si anume materialele de incapsulare si concentratia lor. O modalitate de crestere a stabilitatii microcapsulelor pe baza de alginat de sodiu si de diminuare a pierderii probioticelor pe care le contin o constituie aplicarea unui invelis (coating) de polimeri policationici (chitosan). Chitosanul este un polizaharid natural format din glucoamine si N-acetilglucoamine, cu o mare capacitate de legare a gruparilor carboxilice ale alginatului cu gruparile amino ale chitosanului, ceea ce duce la formarea unei membrane cu rol protector.

Microcapsulele de alginat de sodiu obtinute dupa metoda descrisa in cadrul derularii etapei a 2 a proiectului se imerseaza in solutie de chitosan 0,1%, 0,3% si respectiv 0,4% (w/v), sub agitare continua, la 37⁰C, timp de 40 de minute, obtinandu-se trei variante de microcapsule, care se recupereaza prin centrifugare, se spala cu solutia salina sterila 0,9% si se pastreaza in solutie salina sterila 0,5% pana la utilizare.

Determinarea viabilitatii bacteriilor microincapsulate in alginat-chitosan la actiunea simulantilor gastro-intestinali se realizeaza *in vitro*. Optimizarea testarii viabilitatii celulelor bacteriene incapsulate a fost realizata inainte si dupa expunerea la actiunea sucului gastric si intestinal, timp de 30 si, respectiv, 60 de minute, prin solubilizarea microsferelor in solutie de citrat de sodiu 0,1M, eliberarea probioticelor si inocularea in plăci Petri cu mediu nutritiv MRS agar. Dupa incubare la 37⁰C timp de 24-48 ore, in conditii de aerobioza, se numara. Rezultatele obtinute prin tehnica numararii pe placi se exprima in log₁₀ ufc mL⁻¹. Viabilitatea a inregistrat valori diferite in functie de prezenta capsulei de alginat, absenta sau prezenta coatingului de chitosan si a concentratiei chitosanului. Celulele libere, neincapsulate, au avut cea mai mica rata de supravietuire la sfarsitul intervalului de testare (log⁴ ufc mL⁻¹). In ceea ce priveste probioticele incapsulate, rata de scadere a viabilitatii celulelor incapsulate in matrice de alginat a fost cu log² ufc mL⁻¹ mai mare decat in cazul probioticelor incapsulate in alginat-chitosan. Aplicarea coatingului de chitosan si optimizarea concentratiilor acestuia au dus la obtinerea unor microsfele cu capacitate de supravietuire imbunatatita (log⁸ ufc mL⁻¹). Ca si criteriu de selectie a concentratiei optime de chitosan s-a tinut cont de viabilitatea

probioticului microincapsulat in alginat-chitosan la actiunea simulantului suc gastric, deoarece pH-ul foarte scazut al acestuia (1-2,5) este foarte agresiv pentru bacteriile probiotice.

Pentru a fi eficient, probioticul trebuie sa se regaseasca in suc intestinal la un nivel fiziologic minim de \log^7 ufc mL^{-1} , care sa-i permita aderarea la mucoasa intestinala, rezistenta si colonizarea. Analizand datele experimentale s-a optat pentru sistemul de matrice alginat de sodiu 2% protejat cu coating de chitosan 0,4%, care a dovedit ca asigura viabilitatea optima si in conditiile simulantilor gastrointestinali.

Optimizarea retetelor in functie de stabilitatea la depozitare (partial, numai cu polifenoli) (ICECHIM)

Coordonatorul a refacut pe linia tehnologica demonstrativa probele de suc de mere 11,5⁰ Bx, luand masurile necesare asigurarii conditiilor stricte de sterilitate, atat la prepararea mostrelor de suc, cat si la incorporarea polifenolilor. Polifenolii utilizati au fost extrasi din tescovina provenita din soiul de struguri Komina Vranac de la partenerul din Muntenegru. Ca martor negativ s-au utilizat polifenoli comerciali. Partenerul Expergo a recomandat cresterea cantitatii de polifenoli de la 600 mg/Kg la 1500 mg/Kg, iar la recomandarea partenerului ICECHIM s-a adaugat vitamina C 0,2g/L.

Pentru determinarea stabilitatii la depozitare, variantele experimentale de sucuri furnizate de Coordonator au fost impartite in doua loturi, unul pastrat in frigider la temperatura de 4⁰ C si celalalt la temperatura camerei, si analizate din punct de vedere microbiologic pentru determinarea enterobacteriaceelor, a drojdiilor si a mucegaiurilor la sfarsitul fiecărei saptamanii, timp de 30 de zile.

Din punct de vedere microbiologic, produsul este sigur pentru consum, prin pastrare la temperatura scazuta, pentru o perioada de 30 de zile. Pentru probele pastrate la temperatura camerei, din punct de vedere al limitei maxime admise pentru *Enterobacteriaceae*, produsele se incadreaza, dar prezenta drojdiilor si a mucegaiurilor in cantitati nepermise nu recomanda pastrarea acestor produse la temperatura ridicata decat, eventual, prin adaugarea unui conservant. In concluzie, din punct de vedere microbiologic, sucurile de mere cu polifenoli sunt conforme, daca depozitarea se face pe lantul frigorific.

Pornind de la faptul ca polifenolii au pe langa activitatea antioxidanta si o actiune antibacteriana, se propune, pentru optimizarea retetelor, marirea cantitatii de polifenoli si adaugarea vitaminei C (0,2g/L), cu care polifenolii sunt sinergici, intensificand proprietatile antioxidante ale sucului de mar. Pe de alta parte, este binecunoscut efectul protector al cantitatilor mari de polifenoli asupra vitaminei C, iar faptul ca depozitarea se face la rece

crește stabilitatea acestora. Partenerul Expergo a determinat capacitatea antioxidantă a sucului de mere continuând concentrația de polifenoli de 1500 mg/Kg suc de mere pe care o recomandă ca fiind optimă.

Analiza stabilității produselor funcționale experimentale. Determinarea parametrilor de stabilitate microbiologică, fizico-chimică și senzorială a produselor obținute pe linia demonstrativă. Optimizarea rețetelor și a parametrilor tehnologici (Final, numai optimizare) (EXPERGO)

În etapa a IV-a a proiectului s-a urmărit optimizarea rețetelor și stabilirea gradului de acceptanță și preferință, a produselor funcționale prin testarea pe consumatori a probelor de suc de mere cu „polifenoli”, suc de mere cu „probiotice” și suc de mere cu „probiotice și prebiotice” obținute pe linia demonstrativă a coordonatorului.

Concentrația inițială a polifenolilor (600 mg/L) din probele de suc de mere refăcute pe linia demonstrativă de către coordonator, și păstrate atât în condiții de degradare accelerată (ASLT- la 15⁰C în camera climatică timp de 10 zile), cât și în condiții normale de păstrare (5⁰ C în frigider, timp de 4 săptămâni), a fost cu aprox. 70% mai mică (aprox. 200 mg/L). În urma recomandărilor de optimizare indicate de Expergo, cantitatea de polifenoli a fost mărită la 1500 mg/kg. Cantitatea substanțelor antioxidante identificate în probele de suc de mere cu adaos de polifenoli refăcute pe linia demonstrativă conform recomandărilor de optimizare, a fost de aproximativ 400 mg/kg VCEAC (Vitamin C equivalent antioxidant capacity), având în vedere pragul minim de 300 mg/kg.

Pentru optimizarea rețetelor s-au determinat parametrii de stabilitate microbiologică (NTG, drojii și mușcăiuri), fizico-chimică (pH, aciditate, conductivitate și substanța uscată solubilă, activitatea antioxidantă) și senzorială a băuturilor funcționale. Toate probele de suc de mere (cu polifenoli, probiotice și prebiotice și prebiotice) s-au încadrat în limitele admise pentru numărul total de germeni și drojii și mușcăiuri, așa cum este prevăzut de legislația în vigoare (Ordinul 27/2011, Regulamentul 2073/2005). Parametri fizico-chimici determinați pentru probele analizate s-au încadrat în intervalul optim pe întreaga durată a termenului de valabilitate.

Realizarea experimentală de variante de băuturi funcționale: suc de mere cu probiotice; suc de mere cu probiotice și prebiotice; suc de mere cu antioxidanți (primiti de la partenerul strain) (final, fără polifenoli) (Raureni)

Coordonatorul a produs experimental, pe linia demonstrativă, următoarele variante de băuturi funcționale pe baza de suc de mere 11,5⁰ Bx: suc de mere + prebiotic 15g/L +

probiotic 9,09g/L + vitamina C 0,2g/L; suc de mere + probiotic 9,09g/L + vitamina C 0,2g/L. Toate probele au fost pasteurizate.

Probioticele, reprezentate prin *Lactobacillus plantarum* NCIMB 11974, au fost microincapsulate in matrice de alginat de sodiu 2% cu coating de chitosan 0,4%. Probele realizate au continut si vitamina C si nu au avut conservant.

Probele de suc de mere furnizate de Coordonator au stat la baza derularii activitatilor prevazute pentru fiecare partener.

Optimizarea retetelor in functie de stabilitatea la depozitare (final, fara polifenoli) (ICECHIM)

In scopul verificarii viabilitatii probioticelor libere si incapsulate dupa incorporarea in sucul de mere s-a urmarit stabilitatea lor in timpul depozitarii pe termen de 28 zile la temperatura camerei si la 4°C. Viabilitatea probioticelor este foarte importanta pentru comercializarea sucurilor functionale pe baza de probiotice.

In sucurile de mere obtinute pe linia demonstrativa a coordonatorului s-au adaugat microcapsule si ingredientele vitamina C si prebiotic in cantitatile optimizate in etapele anterioare. In vederea optimizarii viabilitatii probioticelor nu numai in timpul procesarii sucurilor si a depozitarii lor, ci si dupa digestia gastrointestinala, retetele au fost structurate pentru optimizarea proprietatilor functionale prin cresterea concentratiei inoculului la log 9,17 la log 10,4 ufc mL⁻¹ si a cantitatii de microcapsule de la 1g/L la 10 g/L. Probioticele neincapsulate, adaugate ca atare in suc, constituie martorul. Viabilitatea (stabilitatea) culturii probiotice in timpul depozitarii s-a determinat prin metoda numararii pe placi.

Analiza datelor inregistrate arata ca numarul de celule viabile libere si incapsulate se modifica in timpul depozitarii. Bacteriile probiotice libere din sucul de mere isi pierd rapid viabilitatea ajungand la valori extrem de mici (log 2,8) la sfarsitul depozitarii din cauza aciditatii sucului de mar.

Pe de alta parte, bacteriile probiotice microincapsulate, fiind protejate de mediul acid al sucului printr-o dubla bariera fizica, prezinta o viabilitate semnificativ mai mare decat a celor libere.

Rezultatele au aratat ca numarul celulelor viabile, la sfarsitul perioadei de depozitare, corespunde nivelului minim terapeutic recomandat (10⁷ ufc g⁻¹) la momentul consumului. Pentru prelungirea viabilitatii probioticelor, retetele au fost optimizate, obtinandu-se celule viabile mult peste nivelul recomandat (10⁸ ufc g⁻¹). De asemenea, se remarca influenta benefica a prebioticului asupra dezvoltarii probioticului si cresterii viabilitatii acestuia.

In ceea ce priveste probele de sucuri similare, pastrate la temperatura camerei, s-au remarcat modificari ale culorii, continutului de acid citric si scaderea drastica a probioticelor libere si microincapsulate chiar inainte de 14 zile, impunandu-se eliminarea lor din testare.

pH-ul probelor de suc se modifica in timpul depozitarii indiferent daca probioticele sunt libere sau microincapsulate.

In concluzie, microincapsularea probioticelor stabilizeaza sucul de mere ca bautura functionala pe perioada depozitarii. Optimizarea retetelor de suc de mere prin cresterea concentratiei inoculului (culturii starter) si adaugarea a 10 g/L probiotice microincapsulate asigura stabilitatea si viabilitatea bacteriilor in timpul depozitarii, fara pierderea semnificativa a proprietatilor lor functionale, si anume toleranta la trecerea prin tractul digestive si activitatea enzimatica.

Mentinerea viabilitatii celulelor in produse continand probiotice este in continuare o provocare. Sucul de mere este potrivit ca matrice pentru probiotice, consumatorii putand beneficia de proprietatile acestei bauturi functionale.

Producerea de serii pilot a bauturilor functionale pe baza de suc de mere pentru demonstrarea functionalitatii solutiilor tehnice (Raureni)

Avand in vedere cerintele tehnologice necesare producerii de serii pilot de bauturi functionale in conditii optime, Annabella Fabrica de Conserve Raureni a achizitionat pasteurizator cu zona de racire, masina de rasturnare recipieni si suflare cu aer steril si masina automata de ambalare in folie termocontractibila, pentru completarea liniei tehnologice demonstrative.

Au fost elaborate fluxurile tehnologice de obtinere a bauturilor functionale pe baza de suc de mere. Sucul de mere a fost caracterizat organoleptic (culoare: galben pai, aspect: lichid limpede, cu usoara depunere, gust, miros: placute de mere, fara gust si miros strain) si fizico-chimic (densitate: 1,040 g/L, substanta uscata solubila: 11,2 grade Brix, pH=3,76, aciditate: 2,5 g acid malic/L).

Sucul de mere decantat s-a transferat intr-un rezervor de preparare/omogenizare, (capacitate 1000 litri), prevazut cu sistem de recirculare, si cu un sistem propriu de agitare laterala. Sub omogenizare s-au adaugat vitamina C (0,22g/L), sub forma de solutie 10%, preparata in suc de mere si prebioticul (15g/L). Dupa omogenizare, sucul este transferat la utilajul pasteurizator pentru sucuri de fructe cu zona de racire, capacitate de productie: 1200 litri suc de fructe/ora., care asigura pasteurizarea la o temperatura de maxim 92°C, urmata de racire de soc pana la 30°C, cu apa rece in contracurent.

Dozarea sucului pasteurizat cu probiotice, in butelii PET 0,33 L, igienizate cu aer steril, si inchiderea acestora cu capace, s-a efectuat cu ajutorul masinii automate de umplut la cald cu 12 capete de dozare si unul de inchidere ALTEC. In vederea ambalarii, s-a achizitionat o masina de ambalare in folie termocontractibila. Baxurile sunt formate automat, alimentarea cu butelii PET cu produs facandu-se la 90°. Capacitatea de productie este de 15-16 baxuri/minut pentru formate: 2x3,4x3,2x2. Dimensiunile maxime ale baxului sunt: 500x400x380mm, ambalarea facandu-se intr-o singura folie contractibila.

Asistenta tehnologica la realizarea productiei experimentale (ICECHIM)

Pe perioada de derulare a acestui proiect a existat o comunicare si o colaborare permanenta cu partenerul coordonator, in fiecare etapa, oferind asistenta tehnologica in scopul intensificarii legaturii dintre cercetare si productie. Asistenta tehnologica s-a concretizat sub doua forme: asistenta administrativa si suport tehnologic propriu-zis.

Asistenta administrativa a constat in: organizarea de intalniri (workshop-uri); instruire cu ocazia intalnirilor in cadrul consortiului; consultari oferite prin vizite la sediul coordonatorului, telefonic sau prin e-mail; suport in pregatirea materialelor promotionale; suport in redactarea rapoartelor stiintifice.

Asistenta tehnica propriu-zisa a constat in: asistenta tehnica la realizarea liniei demonstrative in scopul eliminarii riscului de contaminare microbiologica a sucurilor de mere cu adaos de polifenoli / prebiotice si probiotice / probiotice; asistenta tehnica pentru dezvoltarea de noi produse functionale (sucuri de mere + polifenoli/prebiotice si probiotice/probiotice); asistenta tehnica la manipularea, dozarea si incorporarea polifenolilor in sucul de mere pentru evitarea fotodegradarii acestora; asistenta tehnica la manipularea, dozarea si incorporarea prebioticelelor si a probioticelelor in sucul de mere cu respectarea conditiilor stricte de sterilitate; asistenta tehnica la producerea de serii pilot de bauturi functionale; asistenta pentru utilizator in valorificarea optima a resurselor (materiale, umane, echipamente, unelte).

Partenerii vor oferi in continuare asistenta tehnica de specialitate pentru implementarea si aplicarea tehnologiilor obtinute in cadrul proiectului si solutionarea problemelor care pot apare in activitatea de productie a noilor bauturi.

Studiu de piata cantitativ. Testarea produselor functionale pe consumatori. Stabilirea gradului de acceptanta si preferinta. Evaluarea feed-backului consumatorilor si definirea eventualelor optimizari de reteta (EXPERGO)

Evaluarea feed-backului consumatorilor a fost realizata printr-un studiu de piata cantitativ, (un test de acceptanta si un test de preferinta) cu un panel de 20 evaluatori selectati

pentru a se stabili gradul de acceptanta si preferinta al produselor functionale fata de doua produse existente in acest moment pe piata.

Pentru o imagine de ansamblu mai buna asupra pozitiei produselor functionale fata de produsele existente, a fost stabilit nivelul de acceptanta in evaluarea hedonica si clasamentul preferintelor consumatorilor chestionati. Din punct de vedere al acceptantei, cele trei bauturi functionale s-au pozitionat pe primele trei locuri in evaluarea hedonica.

Testul de preferinta a scos in evidenta faptul ca adaosul de polifenoli aduce o schimbare de culoare sucului de mere creand o diferenta semnificativa de perceptie pe atributul „culoare” pentru probele de „suc de mere cu polifenoli” fata de probele de „suc de mere cu probiotice” si „suc de mere cu probiotice si prebiotice”.

Inregistrare in lista proprie de produse a noilor produse alimentare functionale. Cerere de brevet/marca inregistrata/desen industrial (Raureni)

Annabella Fabrica de Conserve Raureni a depus o cerere pentru inregistrarea unei marci pe cale nationala, inregistrata cu numar depozit OSIM M2019/05546 din 29.07.2019
Denumirea marcii: Raureni ACTIVE

Pagina web, materiale promo, articole, mobilitate internationala (Raureni)

A fost actualizata pagina web. S-a realizat un fleyer al proiectului care a fost prezentat in cadrul targurilor internationale de profil din Paris, Berlin si New York, la care a participat Annabella Fabrica de Conserve Raureni. A fost publicat un articol intr-o revista cotata ISI, cu factor de impact 2,96. O echipa a UEFISCDI a efectuat o vizita de monitorizare a stadiului de implementare a proiectului, la sediul Annabella Fabrica de Conserve Raureni din judetul Valcea.