

## **Stadiul si rezultatele obtinute in Etapa III/2018**

### **Realizarea unei linii demonstrative de microproductie pentru obtinerea de sucuri naturale functionale (Raureni)**

Obtinerea sucurilor de mere competitive pe piata bauturilor naturale din fructe se realizeaza pe linii de productie, care asigura mentinerea calitatilor nutritionale si a sigurantei alimentare.

Linia tehnologica demonstrativa pentru obtinerea si imbutelierea sucurilor naturale functionale de mere a fost realizata pe linia de preparare si dozare sucuri naturale BIB cu modificari ale traseelor tehnologice, deoarece s-a adaptat instalatia la cantitatea minima de functionare, tinand cont de cantitatea de polifenoli furnizata. Componentele liniei sunt: vase de acumulare B303 si preparare B 304, modul de pasteurizare API Schmidt Bretten A 310 si instalatie de imbuteliere Rapack.

Sucul concentrat este pompat din depozitul frigorific prin intermediul unei pompe cu snec NEMO debit 3mc/h in rezervorul B304 prevazut cu agitator. Se realizeaza cupajarea la concentratia de 11,5 Bx. Sucul obtinut in urma cupajarii este preluat in vasul B303. De aici se alimenteaza modulul de pasteurizare A 310 prin intermediul rezervorului de depozitare intermediar al acestuia, de unde sucul este preluat cu pompa si trecut in schimbatorul cu placi Schimidt 16 TBL. Sucul pasteurizat/racit este dozat prin intermediul unei instalatii de imbuteliere BIB, modificata pentru acest proiect sa dozeze la PET.

Imbutelierea se realizeaza cu o masina semiautomata de umplere FM 2203 fabricata de RAPACK. Selectarea cantitatii de dozat se face prin setarea numarului de impulsuri pe care instrumentul de masurat le are de calculat. In timpul procesului de umplere, la atingerea numaratorii setate, dispozitivul de numarare se reseteaza automat pentru ciclul urmator.

Noua linie de imbuteliere industriala va utiliza aceleasi rezervoare si modul de pasteurizare A 310 la care sunt conectate trasee de alimentare (tur-retur) suc pentru o instalatie de imbuteliere hot filling PV-12-1 ALTEC, prevazuta cu 12 capete de dozare (valve de dozare)) si un cap de inchidere si cu o capacitate maxima de 1500 L (pentru PET de 0,5L).

**Optimizarea tehnologiei de extractiei a polizaharidelor pectice. Optimizarea tehnologiei de microincapsulare a probioticelor. Testarea microcapsulelor cu probiotice si a sinergismului dintre prebiotice si probiotice (ICECHIM)**

Optimizarea tehnologiei de extractie a oligozaharidelor pectice

Din punct de vedere structural, oligozaharidele pectice sunt oligomeri substituiti sau nu si includ oligogalacturonide (OGalA), galactooligozaharide (GalOS), arabino oligozaharide (AraOS), rhamnogalacturonoligozaharide (RhaGalAOS), xilooligo galacturonide (XylOGalA), arabinogalactooligozaharide (Ar GalOS). (Concha-Olmos, 2012, Gullon B, 2013).

In vederea reducerii etapelor de lucru si a optimizarii extractiei oligozaharidelor pectice, extractia s-a realizat pornind de la faina de tescovina de mere utilizand doua enzime diferite in doua etape succesive, enzime care apartin grupelor de hidrolaze sau liaze si sunt specifice legaturilor glicozidice, si anume Celluclast 1,5L si Pectinex ULTRA AFP furnizate de Novozyme.

Parametri extractiei enzimaticе folosind Pectinex Ultra AFP au fost optimizati in mai multe etape, urmarindu-se eficienta extractiei in functie de pH (4, 4,5, 5), raportul solid:lichid (1:5, 1:10; 1:15 g/mL ), temperatura (40<sup>0</sup>C, 45<sup>0</sup>C, 50<sup>0</sup>C), timp de reactie (2,3,4 ore) si doza (50, 75, 100 μL/g substrat ). Experimentele s-au realizat in triplicat, modul de lucru fiind urmatorul: se cantaresc 4 g de faina de tescovina si se amesteca cu apa distilata in raport de 1:5. Pentru optimizarea pH-ului se pastreaza constante temperatura (40<sup>0</sup>C), doza (50μL) si timpul de reactie (2 ore). Valorile de pH testate sunt 4, 4,5 si 5. Valoarea optima a fost cea la care eficienta extractiei a fost cea mai mare, si anume 4,5, si s-a utilizat la optimizarea celorlalti parametri. Pentru optimizarea temperaturii se pastreaza constante doza si timpul de reactie, iar pH-ul s-a ajustat la 4,5 cu o solutie de NaOH 5%. Procedand similar s-au stabilit urmatorii parametri optimizati: raport solid:lichid (g/mL), pH=4,5, temperatura = 45<sup>0</sup>C, doza =100 μL/g substrat, timp de reactie = 2 ore

Pentru enzima Celluclast 1,5L, conditiile optime ale activitatii enzimaticе au fost descrise de Wikiera (2015): raportul solid:lichid 1g/15 mL, doza 50 μl/g de tescovina uscata, temperatura 50<sup>0</sup>C, pH= 4,5, agitare constanta 200 rpm.

Respectand parametri de reactie optimi pentru fiecare enzima, s-au realizat trei variante experimentale de obtinere a oligozaharidelor pectice prin hidroliza enzimaticа a fainii de tescovina. Intr-un pahar Erlenmeyer se amesteca faina de tescovina cu apa

distilata in raport de 1:15 (w/v) si se omogenizeaza timp de 10 minute, la 200 rpm, pe un incubator cu agitare. Se ajusteaza pH-ul la 4,5 cu o solutie de NaOH 5%, valoare recomandata de furnizorul enzimelor si verificata experimental. Se adauga enzima Celluclast 1,5L. Proba se introduce in incubatorul cu agitare si se seteaza parametri de reactie. Dupa epuizarea timpului de hidroliza proba se incalzeste la 80-100<sup>0</sup>C, timp de 10 minute, pentru inactivarea enzimei. Dupa racire, proba se centrifugheaza 15 minute la 5000 rpm. Supernatantul recuperat se introduce intr-un pahar Erlenmeyer, se ajusteaza pH-ul la 4,5 si se adauga enzima Pectinex Ultra AFP. Proba se introduce in incubatorul cu agitare si se seteaza parametri. Dupa epuizarea timpului, se inactiveaza enzima. Din hidrolizatul enzimatic obtinut se ia o alicota pentru analiza cromatografica, iar restul se concentraza la rotavapor. Se obtine o solutie siropoasa cu nuanta maro din cauza oxidarii compusilor fenolici. S-a realizat fluxul tehnologic al procesului de extractie a oligozaharidelor pectice.

Proba de oligozaharide pectice obtinuta in urma hidrolizei enzimatice a fainii de tescovina se caracterizeaza cromatografic la cromatograful de lichide/spectrometrie de masa cu ionizare prin electrospray (LC/ESI-MS), cuplat cu timp de zbor (time-of-flight-TOF), permitand folosirea maselor moleculare pentru o identificare calitativa a oligozaharidelor din hidrolizatul enzimatic. In proba analizata, spectrul de masa obtinut prezinta fragmente de oligozaharide cu mase moleculare de sub 1500 Da, dar si o prezenta a semnalului  $m/z = 202 [M+Na^+]$ , corespunzator prezentei de glucoza. Fragmentele cu greutatea moleculare sub 15 kD, de preferat 1-3 kD atesta prezenta oligozaharidelor pectice.

#### Optimizarea tehnologiei de microincapsulare a probioticelor

Optimizarea procesului de microincapsulare a probioticelor s-a realizat pentru metoda extruderii folosind doua procedee, si anume prin picurare cu seringă si prin pulverizare, initial fara utilizarea probioticelor, pentru stabilirea parametrilor optimi, care influenteaza dimensiunea si forma microcapsulelor, precum si a procedeeului cel mai adecvat de obtinere.

Optimizarea procesului de microincapsulare a probioticelor prin metoda de extrudare procedeul prin picurare cu seringă a urmarit urmatorii parametri: concentratia solutiei de alginat de sodiu, concentratia solutiei de CaCl<sub>2</sub>, diametrul intern al acului de seringă, viteza de rotatie a solutiei de CaCl<sub>2</sub> din baia de intarire, timpul de intarire si distanta de picurare a solutiei de alginat de sodiu fata de baia de intarire.

Solutia de alginat de sodiu se preia cu seringă de 5 mL prevazuta cu ac steril si se picura, de la diferite distante, intr-o baie de intarire continand solutie de CaCl<sub>2</sub> de

concentratii diferite, solutie care poate fi agitata sau nu. Se formeaza microcapsule, care sunt lasate in baie de intarire o perioada de timp variabila, dupa care se preiau.

In urma optimizarii procesului de microincapsulare a probioticelor prin aceasta metoda de extrudare au fost stabiliti urmatorii parametri: concentratia solutiei de alginat de sodiu 2%, concentratia solutiei de CaCl 2%, diametrul intern al acului de seringa 35G (0,17mm x 0,08mm), viteza de rotatie a CaCl<sub>2</sub> 300 rpm, timp de intarire a microcapsulelor 30 minute, distanta de picurare 10 cm. Aplicand acesti parametri optimizati s-a realizat microincapsularea suspensiei de bacterii probiotice *Lactobacillus plantarum* cu o concentratie de 10<sup>8</sup> cel/mL, introdusa in solutia de alginat, obtinandu-se microcapsule cu probiotice cu dimensiuni >500 µm.

In procesul de microincapsulare a probioticelor prin metoda de extrudare prin pulverizare utilizand o instalatie de laborator de microincapsulare prin pulverizare s-a urmarit optimizarea parametrilor presiunea aerului si tipul de duza pentru obtinerea de microcapsule cu diametre < 500 µm.

Solutia de alginat se introduce intr-un vas, care se conecteaza printr-un furtun la duza de pulverizare. Sursa de aer comprimat, regularizata la 6 bari, se scindeaza in 2 cai: una creaza suprapresiune in vasul cu alginat, iar cea de-a doua merge spre duza de pulverizare cu camere de pulverizare interschimbabile, respectiv intern si extern. Ambele cai de aer comprimat sunt prevazute cu regulatoare de aer independente, pentru control individual.

In urma optimizarii procesului de microincapsulare a probioticelor prin metoda de extrudare prin pulverizare au fost stabiliti urmatorii parametri optimi: presiunea lichidului 2 atm, presiunea aerului 2 atm, duza externa.

Testarea microcapsulelor cu probiotice si a sinergismului dintre prebiotice si probiotice

Prebioticele sunt ingrediente alimentare neviabile care confera beneficii de sanatate gazdei, asociate cu modularea selectiva a microbiotei colonice, care consta in promovarea cresterii, activitatii si viabilitatii acesteia. Prebioticele sunt carbohidrati reprezentati prin oligozaharide (fructooligozaharide, galactooligozaharide, isomaltooligozaharide, xylooligozaharide, transgalactooligozaharide, oligozaharide din soia) si unele polizaharide (inulina, amidon modificat, celuloza, hemiceluloza, pectina. Microorganismele probiotice apartin in special familiilor *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*) si *Bifidobacterium*.

Prin combinatia sinergica dintre probiotice si prebiotice se obtin sinbiotice avand ca scop principal supravietuirea microorganismelor probiotice in tractul gastrointestinal. La realizarea sinbiotice sunt cruciale selectia tulpinilor de probiotice metabolic active si de prebiotice si optimizarea formularii sinbiotice pentru stabilirea dozelor corespunzatoare.

In cadrul acestei etape actiunea sinergica dintre probiotic si prebiotic s-a testat utilizand ca prebiotice oligozaharide comparativ cu polizaharide.

*Prepararea suspensiilor celulare bacteriene* a constat in reactivarea celulelor de *Lactobacillus plantarum* NCIMB 11974 prin inoculare in 5 mL MRS lichid steril si incubare la termostat la temperatura de 37°C pentru 24 de ore, in conditii aerobe. Din acest prim pasaj se realizeaza un al doilea pasaj.

Suspensia de celule bacteriene se dilueaza prin aplicarea metodei *dilutiilor zecimale* care consta in amestecul unui volum determinat de suspensie bacteriana cu un volum de noua ori mai mare de mediu. Se transfera acelasi volum de suspensie dintr-o eprubeta in urmatoarea realizandu-se dilutii zecimale, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>....s.a.m.d. Eprubetele se introduc in termostat la 37°C, pentru 24 – 48 - 72 ore, apoi se analizeaza vizual. Dilutia dinaintea ultimei dilutii cu continut slab opalescent contine aproximativ 10<sup>9</sup> celule/mL si constituie inocul pentru testarea sinergismului dintre probiotice si prebiotice.

*Se prepara mediu de cultura* MRS lichid din care se repartizeaza cate 5 mL in eprubete in care se introduc diferite concentratii de prebiotice. Eprubetele se autoclaveaza la 121°C timp de 15 minute.

*Testarea sinergismului dintre prebiotice si probiotice* s-a realizat prin insamantarea a 0,5 mL din suspensia bacteriana inocul cu 10<sup>9</sup> celule/mL in eprubetele autoclavate continand prebiotice in diferite concentratii: MRS + suspensie bacteriana (martor), MRS + 1% oligozaharide pectice, MRS + 2% oligozaharide pectice, MRS + 1% inulina, MRS + 2% inulina. Toate probele se incubeaza in termostat la 37°C pentru 72 de ore.

Pentru evaluarea capacitatii bacteriilor de a utiliza prebioticele s-a monitorizat spectrofotometric cresterea acestora prin masurarea turbiditatii culturii bacteriene in unitati de densitate optica la lungimea de unda de 640 nm. Cele doua prebiotice utilizate au influentat diferit cresterea celulelor de *Lactobacillus plantarum*. Comparativ cu martorul, oligozaharidele pectice in concentratie de 2% au contribuit la cresterea celulelor bacteriene sustinand sinergismul dintre prebiotic si probiotic. Concentratiile de inulina (polizaharid) de 1% si 2% si de oligozaharide pectice de 1% au prezentat modele de crestere aproape identice, similare cu ale martorului.

In urma stabilirii concentratiei optime de prebiotic cu efect sinergic, s-au realizat preliminar microcapsule continand probitoic si prebioticul selectat, care a fost introdus in solutia de alginat si testate in simulanti gastro-intestinali comparativ cu microcapsule continand doar probiotice. In functie de rezultatele preliminare obtinute in urma determinarii numarului de celulele viabile, prin realizarea dilutiilor seriale si insamantare pe placi Petri cu mediu MRS agar, parametri de testare vor fi optimizati in etapa urmatoare.

**Analiza stabilitatii produselor functionale experimentale. Determinarea parametrilor de stabilitate microbiologica, fizico-chimica si senzoriala a produselor obtinute pe linia demonstrativa. Optimizarea retetelor si parametrilor tehnologici (Partea I - fara optimizare) (EXPERGO)**

In etapa a III-a proiectului s-a urmarit determinarea stabilitatii probelor de suc de mere cu adaos de polifenoli (2 tipuri de polifenoli), dar si a analizei efectului consumului acestora, asupra organismului.

Probele de suc de mere cu adaos de polifenoli au fost obtinute de coordonator pe linia demonstrativa. Analiza stabilitatii probelor de suc de mere cu adaos de polifenoli a fost realizata prin determinarea parametrilor: senzoriali, fizico-chimici (pH, aciditate, conductivitate si substanta uscata solubila, activitatea antioxidanta) si microbiologici (Enterobacteriaceae, drojdii si mucegaiuri). Probele au fost pastrate atat in conditii de degradare accelerata (ASLT- la 15<sup>0</sup>C in camera climatica timp de 10 zile), cat si in conditii normale de pastrare (RL-5<sup>0</sup>C in frigider, timp de 4 saptamani), iar analizele fizico-chimice si microbiologice a probelor au fost realizate dupa fiecare saptamana de pastrare in cele doua conditii.

Pentru determinarea stabilitatii senzoriale a fost realizat un test de preferinta (notare) cu un panel format din 20 de evaluatori selectati.

**Realizarea experimentală de variante de bauturi functionale: suc de mere cu probiotice; suc de mere cu probiotice si prebiotice; suc de mere cu antioxidanti (primiti de la partenerul strain) (Partea I - numai cu polifenoli) (RAURENI)**

In cadrul acestei etape s-a obtinut pe linia demonstrativa a Coordonatorului suc natural de mere 11,5<sup>0</sup> Bx, pe o linie tehnologica demonstrativa pentru obtinerea si imbutelierea sucurilor naturale functionale de mere descrisa in capitolul1.

In sucul natural de mere 11,5<sup>0</sup> Bx obtinut conform fluxului tehnologic s-au introdus polifenoli extrasi de partenerul din Muntenegru din doua soiuri diferite de struguri,

Komina Vranac si Petit Vranac. Sucul de mere obtinut a fost imbuteliat in sticle de plastic de 330 mL, in care 600 mg/kg polifenoli au fost introdusi manual, cu seringă, in conditii de sterilitate asigurata prin trei lampi UV. Toata cantitatea de suc a fost pasteurizata, iar in unele probe s-a introdus si conservant.

Coordonatorul a furnizat Partenerilor urmatoarele probe de suc natural de mere obtinute pe linia tehnologica demonstrativa: 9 sticle suc de mere fara polifenoli, dozat la 90<sup>0</sup>C; 20 sticle suc de mere + polifenoli soi Petit Vranac; 20 sticle suc de mere + polifenoli soi Komina Vranac, 38 sticle suc de mere + polifenoli soi Komina Vranac pasteurizate si cu conservant; 38 sticle suc de mere + polifenoli soi Petit Vranac pasteurizate si cu conservant.

### **Optimizarea retetelor in functie de stabilitatea la depozitare (Partea I, cu polifenoli) (ICECHIM)**

Sucurile de fructe prezinta un mediu favorabil pentru actiunea microorganismelor (bacterii, drojdii si mucegaiuri), care produc alterari senzoriale si compositionale. Pentru obtinerea unor sucuri de fructe de calitate se impune respectarea procesului tehnologic si asigurarea conditiilor de igiena. Controlul microbiologic trebuie efectuat sistematic.

Probele de suc de mere cu polifenoli obtinute pe linia demonstrativa a Coordonatorului au fost caracterizate din punct de vedere microbiologic pentru determinarea enterobacteriaceelor, a drojdiilor si a mucegaiurilor. In acest scop, probele au fost impartite in doua loturi si pastrate timp de 30 de zile in conditii de temperatura diferite, la frigider si la temperatura camerei, pentru a vedea influenta acesteia asupra microorganismelor si a evidentia stabilitatea la pastrare (depozitare). Variantele experimentale pentru fiecare lot au fost: 12 sticle suc de mere + polifenoli soi Komina, 12 sticle suc de mere + polifenoli soi Petit, 3 sticle suc de mere fara polifenoli, dozat la 90<sup>0</sup>C.

In urma controlului microbiologic, rezultatele obtinute se incadreaza in limitele maxime admise stabilite prin legislatia sanitar veterinara in vigoare numai la proba martor fara polifenoli, pastrata la frigider. Celelalte probe prezinta valori peste limitele maxime admise pentru drojdii si mucegaiuri, iar pentru enterobacteriacee rezultatele sunt contradictorii. Din cauza contaminarii microbiologice a probelor de sucuri cu polifenoli nu se poate realiza optimizarea retetei in functie de stabilitatea la depozitare. Se recomanda refacerea probelor de suc de mere pe instalatia demonstrativa a Coordonatorului si repetarea examenului microbiologic

**Analiza efectului asupra organismului a consumului de sucuri functionale cu bioingredientele adaugate (prebiotice, antioxidanti, probiotice). Studiu clinic (EXPERGO)**

Analiza efectului asupra organismului a consumului de suc de mere cu adaos de polifenoli a fost realizata prin determinarea capacitatii antioxidante totale (TAC) a unor probe biologice (saliva), prelevate de la 6 voluntari la inceputul si sfarsitul unei perioade de 5 zile in care voluntarii au avut obligatia sa consume o cantitate de 250 mL de suc de mere cu adaos de polifenoli / zi. Analiza probelor finale a evidentiat o crestere semnificativa a TAC, la voluntarii care au consumat probele de suc de mere cu adaos de polifenoli.

**DISEMINAREA REZULTATELOR**

A fost actualizata pagina web. Diseminarea s-a realizat prin prezentarea de comunicari stiintifice sub forma de postere, in cadrul simpozioanelor nationale si internationale.