

UNIVERSITATEA „ȘTEFAN CEL MARE” DIN SUCEAVA

FACULTATEA DE INGINERIE ALIMENTARĂ
Domeniul Ingineria Produselor Alimentare

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Coordonator științific,
Prof. univ. dr. ing. Mircea-Adrian OROIAN

Doctorand,
Biol. Liliana Luca

Suceava
2021

**UNIVERSITATEA „ȘTEFAN CEL MARE” DIN
SUCEAVA
FACULTATEA DE INGINERIE ALIMENTARĂ
Domeniul Ingineria Produselor Alimentare**

TEZĂ DE DOCTORAT

**CERCETĂRI PRIVIND OBTINEREA DE
SINBIOTICE CU BACTERII DIN GENUL
LACTOBACILLUS MICROÎNCAPSULATE
PENTRU APLICAȚII ÎN INDUSTRIA
ALIMENTARĂ
-REZUMAT-**

Coordonator științific,
Prof. univ. dr. ing. Mircea-Adrian OROIAN

Doctorand,
Biol. Liliana Luca

Suceava
2021

Mulțumiri

Odată cu finalizarea acestei etape din viața mea, marcată de sentimente de fericire și împlinire, doresc să adresez alese mulțumiri unor oameni deosebiți, cu calități profesionale și umane de excepție care au făcut posibilă fundamentarea științifică și elaborarea acestei teze de doctorat.

În primul rând, doresc să mulțumesc cu profundă recunoștință domnului prof. univ. dr. ing. Mircea - Adrian OROIAN, conducătorul științific al acestei teze de doctorat, pentru profesionalismul și îndrumarea științifică, răbdarea, ajutorul, ideile și sfaturile oferite cu generozitate, încrederea și înțelegerea de care a dat dovadă în decursul tuturor activităților de cercetare, însuflându-mi curajul de a merge mai departe și, nu în ultimul rând, pentru noblețea sufletească care îl caracterizează.

Un deosebit respect și mulțumiri adresez membrilor comisiei de îndrumare: prof. univ. dr. ing. Sonia AMARIEI, prof. univ. dr. ing. Gheorghe GUTT și prof. univ. dr. ing. Georgiana CODINA și prof. univ. dr. ing. Adriana DABIJA pentru timpul prețios acordat în evaluare lucrării, pentru sfaturile și sugestiile științifice valoroase oferite pe parcursul elaborării tezei de doctorat.

Mulțumesc domnului conf. dr. biol. Andrei LOBIUC pentru sfaturile științifice acordate pentru realizarea acestei cercetări. Doresc să mulțumesc tuturor colegilor de doctorat din cadrul departamentului dar în mod deosebit colegilor: drd. Daniela Pauliuc, drd. Ionuț Avramia, drd. Florin Ursachi, drd. Ancuța Chetrariu, drd. Ancuța Petraru, drd. Madalina Iuga și drd. Mariana Spinei, cât și foștilor colegi de doctorat care m-au sprijinit și încurajat în fiecare moment dificil și alături de care am beneficiat de un cadru ambiental foarte plăcut.

Aleasă considerație și mulțumiri colectivului din cadrul laboratorului policlinicii Bethesda pentru sprijinul emoțional oferit și în special dnei dr. Liliana Oprea și d-nei biol. med. sp. Mihaela Carceanu care mi-au fost alături ori de câte ori a fost nevoie, atât în momentele de bucurie, cât și în cele mai puțin fericite. Totodată, doresc să adresez mulțumiri tuturor prietenilor pentru sprijinul moral și încurajările oferite pe tot parcursul acestui traseu.

O prețuire nespusă o am pentru părinții mei care întotdeauna m-au încurajat și m-au sprijinit cu tot ce le-a stat în putință să îmi urmez și realizez visele. Au fost lângă mine ori de câte ori am avut nevoie, oferindu-mi sprijin moral. Nu pot să mulțumesc în cuvinte pentru cât au făcut pentru mine de-a lungul vieții mele de până acum.

Mulțumesc persoanei care m-a sprijinit și a fost alături de mine ori de câte ori a fost nevoie, mai ales în momentele în care reușita analizelor părea un lucru imposibil de atins. Mai mult decât atât, sfaturile și exemplele despre cum să lupt pentru a-ți îndeplini obiectivul sau visul, nu au încetat să mă uimească și să mă inspire. Această persoană minunată este Bogdan, soțul meu dar mai ales prietenul meu cel mai bun.

Cu deosebită recunoștință și dragoste, dedic această teză Tăticului.

Liliana Luca

CUPRINS

Listă de abrevieri.....	9
Scopul și obiectivele tezei de doctorat.....	10
Capitolul I. Stadiul actual al cercetărilor în domeniul utilizării probioticelor, prebioticele și sinbioticele în produsele alimentare.....	12
I.1. Introducere în studiul probioticelor	12
I.1.1. Introducere	12
I.1.2. Istoric	12
I.2. Probiotice utilizate în industria alimentară	14
I.2.1. Taxonomia probioticelor.....	14
I.2.2. Utilizarea probioticelor în industria alimentară	16
I. 2.2.1 Forme comerciale ale probioticelor	16
I.2.2.2. Produse alimentare probiotice.....	19
I.2.3. Microîncapsularea probioticelor	24
I.2.3.1. Generalități - definiție	24
I.2.3.2. Factori ce afectează viabilitatea probioticelor	25
I.2.3.3. Materiale și tehnici de încapsulare.....	29
I.3. Influența probioticelor asupra sănătății umane.....	40
I.3.1. Generalități.....	40
I.3.2. Caracteristicile și mecanismul de acțiune al probioticelor.....	40
I.3.2.1. Caracteristicile probioticelor.....	40
I.3.2.2. Mecanismul de acțiune a probioticelor	42
I.3.2.3. Afecțiuni tratate cu ajutorul probioticelor.....	45
I.4. Prebiotice	50
I.4.1. Definiție și surse prebiotice	50
I.4.2. Beneficiile prebioticele asupra sănătății	51
I.5. Sinbiotice	52
I.6. Concluzii parțiale	54
Capitolul II. Cercetări privind microîncapsularea probioticelor în matrici polimerice.....	55
II.1. Introducere.....	55
II.2. Materiale și metode.....	57
II.2.1. Microorganisme probiotice.....	57
II.2.2. Surse prebiotice	57
II.2.3. Reactivi.....	57
II.2.3.1. Medii de cultură.....	57
II.2.3.2. Reactivi pentru încapsulare.....	59
II.2.3.3. Reactivi pentru sucuri digestive.....	59
II.2.4. Echipamente	59
II.2.5. Metode de lucru și analiză	61
II.2.5.1. Prepararea mediilor de cultură.....	61

II.2.5.2. Prepararea inoculului și reactivarea microorganismelor probiotice	62
II.2.5.3. Consumul de prebiotice - metode de analiză	63
II.2.5.4. Procedura de microîncapsulare	65
II.2.5.5. Numărul de celule viabile	66
II.2.5.6. Numărul de celule viabile din microcapsule.....	67
II.2.5.7. Eficiența procesului de microîncapsulare (E%) și rata de viabilitate (R%).....	67
II.2.5.8. Viabilitatea celulelor probiotice încapsulate în timpul depozitării	67
II.2.5.9. Viabilitatea celulară în sucuri gastrointestinale simulate	68
II.2.5.10. Caracterizarea microcapsulelor sinbiotice	69
II.2.5.11. Analiza statistică a datelor experimentale.....	69
II.3. Rezultate și discuții.....	70
II.3.1. Studiul efectului prebioticelor asupra creșterii biomasei celulare.....	70
II.3.2 Studiul privind caracterizarea morfologică a microcapsulelor.....	78
II.3.2.1. Evaluarea diametrului mediu și distribuția dimensiunii microcapsulelor.....	84
II.3.2.2. Acțiunea sucurilor gastrointestinale asupra dimensiunilor microcapsulelor.....	86
II.3.3. Studiul privind numărul de celule probiotice viabile și eficiența microîncapsulării.....	89
II.3.4 Studiul viabilității celulelor probiotice microîncapsulate în timpul depozitării.....	90
II.3.5. Studiul viabilității celulare în condiții gastrointestinale simulate	95
II.4. Concluzii parțiale.....	99

Capitolul III. Cercetări privind utilizarea microcapsulelor sinbiotice în iaurt	101
III.1. Introducere	101
III.2. Materiale.....	103
III.2.1. Materiale pentru obținerea iaurtului probiotic.....	103
III.2.1.1. Microcapsule sinbiotice.....	103
III.2.1.2. Ingrediente pentru obținerea iaurtului	103
III.2.2. Reactivi	104
III.2.2.1. Reactivi pentru sucuri digestive	104
III.2.2.2. Medii de cultură	104
III.2.2.3. Reactivi pentru dizolvarea matricei de încapsulare și efectuarea diluțiilor	104
III.2.3. Echipamente	104
III.3. Metode de analiză.....	105
III.3.1. Prepararea iaurtului din lapte de vacă cu microcapsule sinbiotice....	105
III.3.2. Determinarea viabilității celulelor probiotice microîncapsulate în iaurt pe perioada depozitării refrigerate.....	106
III.3.3. Determinarea viabilității probioticelor microîncapsulate din iaurt <i>in vitro</i> în suc gastric simulat.....	107

III.3.4. Determinarea viabilității probioticelor microîncapsulate din iaurt <i>in vitro</i> în suc intestinal simulat.....	107
III.3.5. Determinarea ratei de viabilitate (R%)	108
III.3.6. Determinarea evoluției pH-ului din iaurt.....	108
III.3.7. Determinarea acidității titrabile	108
II.3.8. Determinarea parametrilor de textură ale iaurtului	108
II.3.9. Determinarea proprietăților reologice ale iaurtului	109
III.4. Analiza statistică	109
III.5. Rezultate și discuții.....	109
III.5.1. Studiul viabilității tulpinilor probiotice după obținerea iaurtului.....	109
III.5.2. Studiul viabilității tulpinilor probiotice în iaurt în timpul depozitării.....	112
III.5.3. Studiul viabilității tulpinilor probiotice din iaurt în sucuri gastrointestinale simulate	113
III.5.4. Studiul caracteristicilor fizico-chimice ale iaurtului	115
III.5.4.1. Studiul evoluției acidității titrabile și a pH-ului	116
III.5.4.2. Influența microcapsulelor sinbiotice asupra texturii iaurtului ..	118
III.5.4.3 Studiul proprietăților reologice ale iaurtului.....	120
III.6 Concluzii parțiale	124

Capitolul IV. Cercetări privind utilizarea probioticelor microîncapsulate în iaurt vegetal din lapte de ovăz..... 125

IV.1. Introducere	125
IV.2. Materiale	127
IV. 2.1. Materiale pentru obținerea iaurtului cu microcapsule sinbiotice din lapte vegetal	127
IV.2.1.1. Ingrediente pentru obținerea iaurtului	127
IV.2.1.2. Microcapsule sinbiotice	127
IV.2.2. Reactivi	127
IV.2.3. Echipamente.....	128
IV.3. Metode de analiză	128
IV.3.1. Prepararea iaurtului din lapte de ovăz cu prebiotice	128
IV.3.2. Determinarea viabilității probioticelor microîncapsulate în iaurtul vegetal	129
IV.3.3. Determinarea ratei de viabilitate celulară (R%)	130
IV.3.4. Determinarea evoluției pH-ului din iaurtul vegetal.....	130
IV.3.5 Determinarea acidității titrabile	131
IV.3.6. Determinarea colorimetrică.....	131
IV.3.7. Determinarea parametrilor de textură a iaurtului.....	132
IV.3.8. Determinarea proprietăților reologice ale iaurtului vegetal	132
IV.3.9. Extracția și identificarea aminoacizilor liberi	133
IV.3.10. Determinarea acizilor organici	133
IV.3.11. Analiza senzorială a produsului.....	134
IV.4. Analiza statistică	134
IV.5. Rezultate și discuții	135

IV.5.1. Studiul viabilității tulpinilor probiotice din iaurtul din lapte de ovăz	135
IV.5.2. Studiul viabilității tulpinilor probiotice din iaurtul din lapte de ovăz în sucuri gastrointestinale simulate <i>in vitro</i>	137
IV.5.3. Studiul caracteristicilor fizico-chimice ale iaurtului din lapte de ovăz	138
IV.5.3.1. Studii privind determinarea culorii	139
IV.5.3.2. Studiul evoluției acidității titrabile și a pH-ului	141
IV.5.3.3. Studiul influenței microcapsulelor sinbiotice asupra texturii iaurtului din lapte de ovăz	142
IV.5.3.4. Proprietățile reologice ale iaurtului din lapte de ovăz	143
IV.5.4. Analiza senzorială	145
IV.5.5. Studiul conținutului de acizi organici	147
IV.5.6. Studiul conținutului de aminoacizi	149
IV.6. Analiza componentelor principale	152
IV.7. Concluzii parțiale	155
Capitolul V. Concluzii generale	157
Diseminarea rezultatelor cercetărilor	160
Bibliografie	161
Anexe	191

Listă de abrevieri

GIT - tractul gastrointestinal
LAB - bacterii producătoare de Acid Lactic
ISAPP - Asociația Științifică Internațională pentru Probiotice și Prebiotice
FAO - Organizația pentru Alimentație și Agricultură
UFC - unități formatoare de colonii
STH - amidon solubil din cartofi
INU - inulină din cicoare
OLI - oligofructoză
MRS - mediu de cultura Man-Rogosa-Sharpe
MRS FG - mediu de cultura Man-Rogosa-Sharpe fara glucoza
MRS G/OLI/STH/INU - mediu de cultura Man-Rogosa-Sharpe modificat
G - glucoză
OMS - Organizația Mondială a Sănătății
FAO - Organizația pentru Alimentație și Agricultură (Food and Agriculture Organization)
ISAPP - Asociația Științifică Internațională pentru Probiotice și Prebiotice
EPS - exopolizaharide
WGO - Ghid de practică al Organizației Mondiale de Gastroenterologi
GC-MS - cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT

Scopul tezei de doctorat a fost realizarea unor cercetări privind dezvoltarea de noi rețete optime pentru matricea de încapsulare a microorganismelor probiotice cu aplicabilitate industrială.

Cercetările derulate pe parcursul studiilor de doctorat au vizat mai multe obiective științifice:

- Studiul bibliografic al literaturii de specialitate privind utilizarea microorganismelor probiotice cu aplicații în industria alimentară, metode de microîncapsulare și efectele consumului de probiotice asupra sănătății umane.
- Studiarea evoluției tulpinilor de bacterii din genul *Lactobacillus* în diferite medii cu scopul stabilirii condițiilor optime de dezvoltare.
- Microîncapsularea bacteriilor din genul *Lactobacillus* în diferite matrici polimerice prebiotice pentru obținerea de sinbiotice cu viabilitate celulară ridicată.
- Testarea viabilității celulare din microcapsulele sinbiotice în sucuri gastrice și intestinale simulate
- Dezvoltarea și caracterizarea a două produse alimentare (iaurt și iaurt vegetal de ovăz) cu sinbiotice cu scopul stabilirii viabilității celulare a bacteriilor din genul *Lactobacillus*

Cuvinte cheie:

Probiotice, prebiotice, sinbiotice, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, dimensiune, microîncapsulare, viabilitate, iaurt din lapte de vacă, iaurt din lapte de ovăz.

Ca structură, teza de doctorat intitulată „*CERCETĂRI PRIVIND OBȚINEREA DE SINBIOTICE CU BACTERII DIN GENUL LACTOBACILLUS MICROÎNCAPSULATE PENTRU APLICAȚII ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ*” cuprinde două părți, fiind împărțită în cinci capitole. În prima parte este prezentată o sinteză a datelor de literatură cu privire la studiul probioticelor și utilizarea acestora în industria alimentară, în timp ce în partea a doua sunt prezentate contribuțiile originale la aceste două domenii. Fiecare capitol se încheie cu concluzii parțiale iar la urmă acestea sunt dezvoltate într-un capitol de concluzii generale. De asemenea, teza cuprinde listă de abrevieri, referințe bibliografice și o listă cu diseminarea rezultatelor cercetării.

Capitolul I al acestei teze, „*Stadiul actual al cercetărilor în domeniul utilizării probioticelor, prebioticele și sinbioticele în produsele alimentare*”, expune date din literatura de specialitate privind istoricul descoperirii microorganismelor probiotice, partea de taxonomie, efectele

probioticele asupra sănătății umane ca urmare a utilizării individuale sau în diferite asocieri și utilizarea lor în industria alimentară.

Utilizarea microorganismelor probiotice în alimente a fost criticată deoarece există mai mulți factori responsabili de pierderea viabilității celulare în timpul producției (de exemplu fermentația), procesării (pH scăzut, oxigen, temperatura de fermentație/incubare, rata de răcire, compoziția matricei alimentare, disponibilitatea nutrienților) și depozitării (materialele de ambalare, metodele de stocare, temperatura). Condițiile tractului gastrointestinal (pH-ul scăzut al stomacului și prezența sărurilor biliare din intestinul subțire) pot afecta de asemenea viabilitatea probioticelor. Toate acestea au generat necesitatea dezvoltării unor tehnologii adecvate pentru menținerea viabilității celulare.

Dintre toate tehnologiile existente, în acest studiu, s-au analizat următoarele tehnici de încapsulare: extrudarea, emulsia și uscarea prin pulverizare. Toate aceste metode au prezentat atât avantaje cât și dezavantaje în încapsularea probioticelor.

Uscarea prin pulverizare, poate fi considerată cea mai eficientă metodă din punct de vedere al costurilor, a disponibilității echipamentelor, a dimensiunii particulelor, a volumelor de procesare și a faptului că este un proces continuu (Behboudi-Jobbehdalet al., 2013). Cu toate acestea, viabilitatea celulelor probiotice poate fi influențată în mod semnificativ de condițiile de uscare prin pulverizare.

Microîncapsularea prin gelifierea ionică externă este foarte exploatată prin utilizarea polizaharidelor naturale. Pentru această tehnică nu se folosesc solvenți organici și se efectuează la temperatura camerei, fiind una dintre cele mai blânde metode pentru încapsularea probioticelor. Cu toate acestea, un dezavantaj al acestei tehnici este porozitatea pe care o prezintă particulele și care poate afecta viabilitatea materialului încapsulat (de Araújo Etchepare et al., 2016).

În prezentul studiu s-a urmărit totodată și realizarea unei analize a impactului pe care tehnicile și materialele de încapsulare îl prezintă asupra procesului global de obținere a microcapsulelor, asupra caracteristicilor acestora dar și asupra menținerii unei viabilități celulare ridicate.

Materialele de încapsulare studiate în general sunt: alginatul de sodiu, alginatul de calciu, caragenanul, amidonul, proteinele din zer, chitosanul etc. Alginatul de sodiu este unul dintre polimerii cei mai folosiți ca material de încapsulare, deoarece formează o matrice extrem de accesibilă, biocompatibilă și non-toxică pentru protecția ingredientelor active, în special a microorganismelor probiotice și a celulelor sensibile la diverși factori la care produsele alimentare sunt expuse în timpul procesării și depozitării. Deși alginatul de sodiu este potrivit pentru încapsulare, gelul său este poros și sensibil la valori de pH extreme, afectând astfel atât eliberarea cât și protecția compușilor (Mortazavian & Sohravandi, 2007). Există mai multe modalități de a depăși acest obstacol și de a îmbunătăți stabilitatea microorganismelor, de exemplu, adăugarea unui substrat nutritiv în compoziția capsulei (Chen, K. N et al., 2005).

Studiul probioticelor a condus la dezvoltarea prebioticelor. Conform Asociației Științifice Internaționale pentru Probiotice și Prebiotice (ISAPP), prebioticele sunt definite ca „un substrat selectiv utilizat de microorganismele gazdă care oferă beneficii pentru sănătate”. Legumele, fructele și cerealele reprezintă surse prebiotice datorită conținutului de: pirodextrinele, amidon, inulină, oligofructoză, xiloză, galactoză etc. (Kerry et al., 2018).

Din asocierea unui probiotic și a unui prebiotic rezultă un produs sinbiotic care poate crește viabilitatea celulară a probioticului în timpul producției și depozitării, dar în același timp îmbunătățește efectele asupra intestinului. (Raddatz et al. 2019, De Prisco et al. 2016).

S-a observat că tehnica de încapsulare prin extrudare și utilizarea alginatului de sodiu alături de un substrat nutritiv prezintă numeroase avantaje ce recomandă integrarea acestei asocieri în procesul industrial de obținere a microcapsulelor ușor de utilizat, stabile și ieftine cu caracteristici fizico-chimice superioare.

Capitolul II intitulat „Cercetări privind microîncapsularea probioticelor în matrici polimerice” prezintă experimentele ce au avut ca scop dezvoltarea de noi rețete optime pentru matricea de încapsulare a unor microorganisme probiotice. S-a urmărit evaluarea diferitelor combinații de alginat de sodiu și alți biopolimeri adjuvanți precum inulina din cicoare, oligofructoza, amidonul din cartofi și glucoza. S-a studiat care combinație este cea mai eficientă și în ce concentrație rezultă formula optimă pentru îmbunătățirea supraviețuirii tulpinilor probiotice.

În prima parte a studiului, pe baza analizei efectuate în capitolul I, au fost selectate tulpinile probiotice: *Lactobacillus casei* 431®, *Lactobacillus plantarum* și *Lactobacillus rhamnosus*. Prima tulpină este o marcă înregistrată Christian Hansen și a fost achiziționată de la reprezentanții acestui institut din România. Celelalte două tulpini formează o cultură mixtă sub numele Bioprox RP 80 din Franța, distribuită de SC Enzymes & Derivates SA (România, Piatra Neamț). Aceste tulpini sunt utilizate deja în industria alimentară de câțiva ani pentru îmbogățirea alimentelor precum: iaurtul, laptele bătut, bănza proaspătă, smântâna, cașcavalul etc. dar nu în formă încapsulată. Până în prezent, din cercetările literaturii de specialitate, s-a constatat că această asociere de probiotice: *Lactobacillus casei* 431® + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus rhamnosus* din studiul de față nu a fost realizată.

Ca prim obiectiv după selectarea tulpinilor probiotice, a fost alegerea substraturilor nutritive vegetale în vederea creșterii biomasei celulare și, implicit, a viabilității acesteia. Astfel, prebioticele alese au fost inulina din cicoare, amidonul din cartofi și oligofructoza. Pentru aceasta s-au efectuat experimente în vederea stabilirii parametrilor optimi de cultivare a tulpinilor alese pentru procesul de microîncapsulare în timpii optimi. În acest context sunt prezentate cercetările privind testarea activității prebiotice

și măsurarea creșterii biomasei prin metode fizico-chimice și microbiologice.

Înlocuirea glucozei din mediul de cultură original Man-Rogosa-Sharpe (MRS) cu prebiotice, a favorizat creșterea biomasei celor trei tulpini de lactobacili atât din culturile individuale cât și din cultura mixtă studiată în timpul incubăției la 37 °C. Efectul prebioticelelor asupra creșterii biomasei celulare a fost monitorizat separat pentru tulpina *Lactobacillus casei* pentru o perioadă de 12 h (Fig. 2.1), apoi pentru *L. plantarum* și *L. rhamnosus* pentru o perioadă de 10 h (Fig. 2.2 și Fig. 2.3) și ulterior pentru cultura mixtă de lactobacili pentru o perioadă de 10 h (Tab. 2.1). Monitorizarea a fost efectuată din două în două ore urmărind evoluția pH-ului (Tab.2.2), densitatea optică prin spectrofotometrie (Fig. 2.1, Fig. 2.2) și inocularea în mediu MRS agar pentru numărătoare de colonii (Tab. 2.1 și Fig. 2.3). S-a constatat totuși că determinarea biomasei celulare efectuată cu ajutorul spectrofotometrului Jenway 6400 (Jenway Ltd, Marea Britanie) la o lungime de undă de 600 nm nu oferă rezultate exacte ale creșterii biomasei celulare în mediile de cultură întrucât sunt măsurate toate celulele: celule vii, celule în stare latentă și celule moarte.

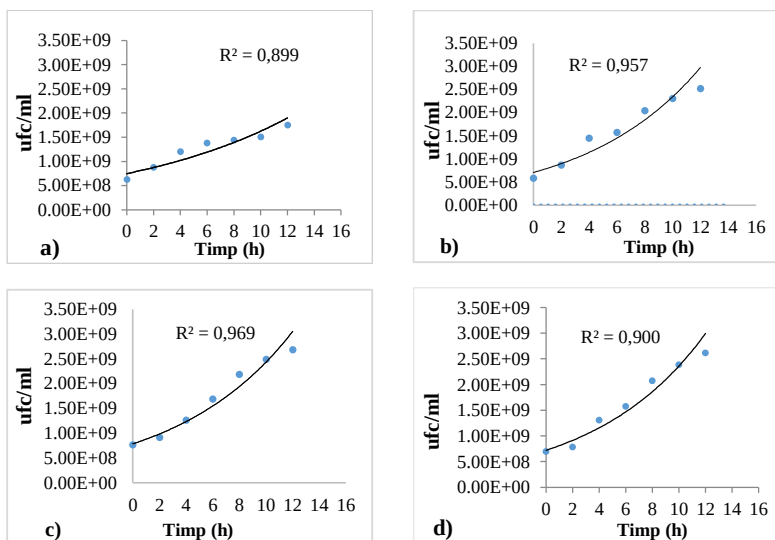


Fig. 2.1 Creșterea biomasei celulare a speciei *L. casei* în mediile de cultură modificate: a) amidon, b) inulină, c) oligofructoză și d) glucoză raportate la curba McFarland în mediile de cultură MRS modificate

Tab. 2.1. Număr de celule viabile din cultura mixtă după 10 h de monitorizare.

Timp (h)	MRS G (log ₁₀ ufc/ml)	MRS FG (log ₁₀ ufc/ml)	MRS INU (log ₁₀ ufc/ml)	MRS OLI (log ₁₀ ufc/ml)	MRS STH (log ₁₀ ufc/ml)
0	8,51 ± 0,01 ^{dA}	8,53 ± 0,03 ^{CA}	8,48 ± 0,02 ^{aA}	8,49 ± 0,01 ^{aA}	8,46 ± 0,02 ^{aA}
2	8,96 ± 0,01 ^{eD}	8,56 ± 0,01 ^{CA}	8,75 ± 0,02 ^{bB}	8,81 ± 0,01 ^{bC}	8,57 ± 0,02 ^{bA}
4	9,01 ± 0,01 ^{eB}	8,62 ± 0,02 ^{CA}	9,06 ± 0,01 ^{cB}	9,17 ± 0,01 ^{cC}	8,58 ± 0,03 ^{bA}
6	8,32 ± 0,04 ^{cB}	7,70 ± 0,02 ^{bA}	9,15 ± 0,03 ^{cC}	9,49 ± 0,01 ^{dD}	9,48 ± 0,04 ^{dD}
8	7,84 ± 0,02 ^{bA}	7,61 ± 0,06 ^{bA}	9,51 ± 0,03 ^{dB}	9,51 ± 0,04 ^{dB}	9,32 ± 0,04 ^{eB}
10	7,30 ± 0,02 ^{aB}	3,60 ± 0,01 ^{aA}	9,64 ± 0,02 ^{eD}	9,52 ± 0,01 ^{dC}	9,54 ± 0,01 ^{dC}

Mediul de cultură MRS G – realizat conform rețetei originale, mediul de cultură MRS FG – fără sursă de carbon, mediul de cultură MRS INU – cu inulină ca sursă de carbon, mediul de cultură MRS OLI – cu oligofructoză ca sursă de carbon, mediul de cultură MRS STH – cu amidon din cartofi ca sursă de carbon. Valorile sunt exprimate în log₁₀ ufc/ml și reprezintă media ± deviația standard a trei replici. Superscriptele cu litere mici sunt utilizate pentru a diferenția valorile între rânduri, în timp ce superscriptele cu litere mari pentru a diferenția valorile între coloane.

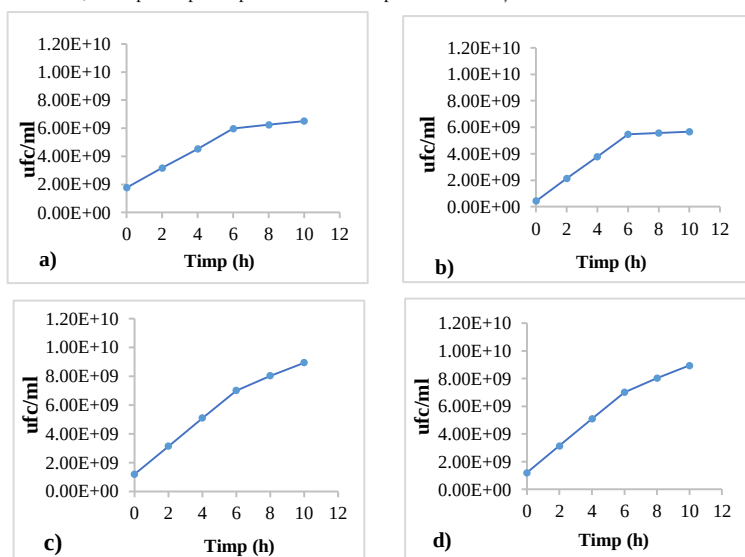


Fig. 2.2. Creșterea biomasei celulare pentru *L. plantarum* și *L. rhamnosus* raportate la curba McFarland în mediile de cultură MRS modificate: a) mediu MRS fără glucoză, b) mediu MRS fără glucoză, c) mediu MRS cu oligofructoză și d) mediu MRS cu inulină

Pe parcursul celor 10 ore de monitorizare a creșterii biomasei celulare la 37 °C, s-a observat că în mediile de cultură utilizate ca martor, MRS FG și MRS G, lactobaciliile au avut o ușoară creștere în primele 4 ore. Din cauza unei necesități crescute de energie metabolică, în cazul MRS FG și MRS G, rezervele nutriționale au fost limitate și prin urmare, numărul de celule viabile a început să scadă începând cu a 6-a oră de monitorizare.

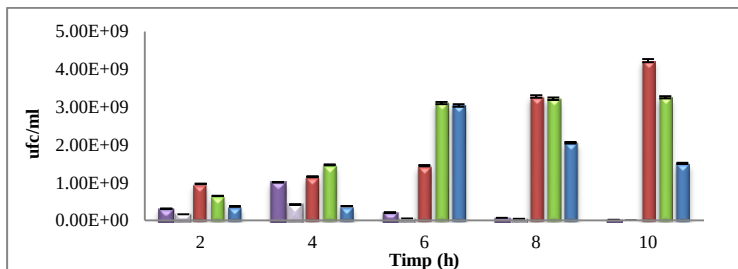


Fig. 2.3 – Creșterea biomasei celulare pentru speciile *Lactobacillus plantarum* și *Lactobacillus rhamnosus* (■ MRS Mediu de cultura cu glucoza, ■ MRS FG – mediu de cultură fără glucoză, ■ MRS INU – mediu de cultura cu inulină, ■ MRS OLI – mediu de cultura cu oligofructoză, ■ MRS Sth – mediu de cultura cu amidon), ufl/ml – unități formatoare de colonii/ml.

Datele experimentale au arătat că biomasa celulară a crescut mai mult ($p < 0,05$) în prezența inulinei, comparativ cu celelalte substraturi. În urma analizei statistice s-a constatat că la momentul 0 nu există diferențe semnificative ($p > 0,05$) între creșterile biomasei celulare pe diferitele medii luate în studiu. Dacă după 10 h de monitorizare a biomasei celulare, între MRS OLI și MRS STH, nu s-a observat o diferență semnificativă ($p > 0,05$), între toate celelalte medii de cultură această diferență a fost observată ($p < 0,05$). Faptul că mediul cu inulină a fost favorabil creșterii biomasei celulare în detrimentul mediului cu amidon poate fi explicat prin structura chimică complexă a amidonului comparativ cu cea a inulinei și oligofructozei. Legăturile chimice ale amidonului s-au scindat mai greu ca urmare a procesului metabolic al microorganismelor. Creșterea biomasei celulare pe mediile de cultură cu diferite tipuri de surse de carbon (INU, OLI, STH) a arătat capacitatea tulpinilor de lactobacili de a descompune prebioticele studiate. Se pare că, așa cum s-a menționat mai sus, structura chimică are un rol important în procesul de metabolizare a surselor de carbon de către lactobacili și viteza cu care are loc.

Eficacitatea activității prebiotice a fost, de asemenea, observată prin monitorizarea evoluției acidității mediului de cultură (Tab. 2.2) pentru fiecare tip de prebiotic. În ceea ce privește evoluția pH-ului, rezultatele au arătat că, după 10 h de incubare, odată cu creșterea concentrației celulare, valoarea pH-ului scade cu fiecare citire a intervalului. Creșterea acidității mediilor a avut loc ca urmare a consumului sursei de carbon și, probabil, a transformării acesteia în acizi organici (Pimentel-González et al., 2009). Acest lucru se datorează faptului că bacteriile homofermentatoare fermentează zaharurile în principal în acid lactic, iar bacteriile heterofermentatoare pe lângă acidul lactic produc și alte produse cum ar fi: acid acetic, etanol, CO_2 și acid formic, diacetil, acetoină și 2,3-butandiol din citrat, peptide bioactive din catabolismul aminoacizilor și exopolizaharide din carbohidrați (de Souza Oliveira et al., 2012).

Tab. 2.2. Modificările de pH pe timpul perioadei de monitorizare pentru *L.plantarum* + *L.rhamnosus*

Tip de mediu	Timp (h)					
	0	2	4	6	8	10
MRS STH	5,90±0,12 ^{dD}	4,97±0,03 ^{aC}	4,65±0,08 ^{aD}	4,41±0,01 ^{aA}	4,40±0,14 ^{bA}	4,36±0,11 ^{cA}
MRS OLI	5,95±0,06 ^{bF}	5,01±0,01 ^{abE}	4,66±0,04 ^{aD}	4,49±0,02 ^{bC}	4,36±0,01 ^{aB}	4,27±0,02 ^{aA}
MRS INU	5,90±0,06 ^{cE}	5,08±0,01 ^{bD}	4,71±0,02 ^{bC}	4,51±0,01 ^{bB}	4,35±0,02 ^{aA}	4,32±0,02 ^{bA}
MRS	5,90±0,06 ^{aF}	5,16±0,06 ^{cE}	5,06±0,01 ^{dD}	4,99±0,02 ^{dC}	4,81±0,02 ^{cB}	4,50±0,01 ^{dA}
MRS FG	6,00±0,01 ^{cE}	5,12±0,05 ^{cD}	4,94±0,01 ^{cC}	4,55±0,01 ^{cD}	4,43±0,01 ^{bA}	4,38±0,01 ^{cA}

MRS STH – mediu de cultură cu amidon; MRS OLI – mediu de cultură cu oligofructoză; MRS INU – mediu de cultură cu inulină; MRS – mediu de cultură cu glucoză; MRS FG – mediu de cultură fără glucoză. Valorile sunt rezultatul a trei determinări și sunt exprimate ca valoare medie ± abaterea standard. Literele mici sunt utilizate pentru a diferenția valorile între rânduri, în timp ce literele mari pentru a diferenția valorile între coloane.

Rezultatele au arătat că producția de biomasă celulară și consumul de substrat au crescut semnificativ după 10 și respectiv 12 h pentru mediul de cultură suplimentat cu prebiotice. Creșterea biomasei celulare pe mediile de cultură cu diferite tipuri de surse de carbon a arătat capacitatea tulpinilor de lactobacili de a descompune prebioticele studiate, atingând astfel un alt obiectiv al acestei teze.

Cele trei surse de carbon testate au condus la o îmbunătățire a creșterii biomasei celulare comparativ cu substraturile de control. Rezultatele obținute au condus la validarea utilizării prebioticele testate atât ca substrat nutritiv, cât și ca material de încapsulare.

În cea de a doua parte a capitoului, datele experimentale prezentate relevă obținerea unor rețete optime pentru matricea de microîncapsulare celulară care să ofere proprietăți superioare în ceea ce privește caracteristicile fizico-chimice ale microcapsulelor. De asemenea se prezintă dezvoltarea unui sistem inovativ de protecție al celulelor probiotice bazat pe microîncapsulare prin extrudare în matricile de alginat-prebiotic.

În definirea rețetelor optime un rol important l-a avut caracterizarea morfologiei microcapsulelor cu ajutorul microscopiei optice și microscopiei electronice cu scanare (Fig. 2.4, Fig.2.5, Fig.2.6 și Fig.2.7). Aceasta a ajutat la o mai bună înțelegere a posibilelor modificări morfologice sau structurale ale microcapsulelor în timpul procesului de microîncapsulare.

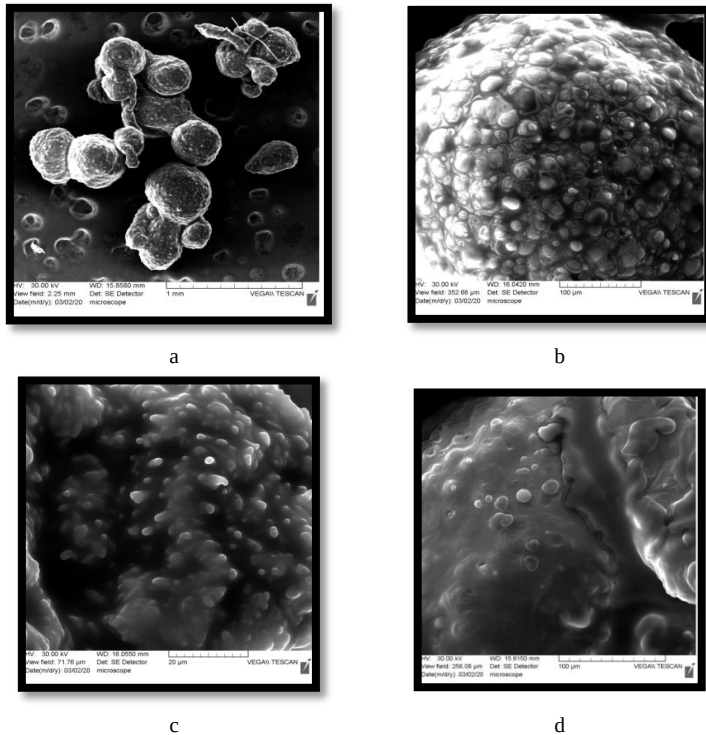
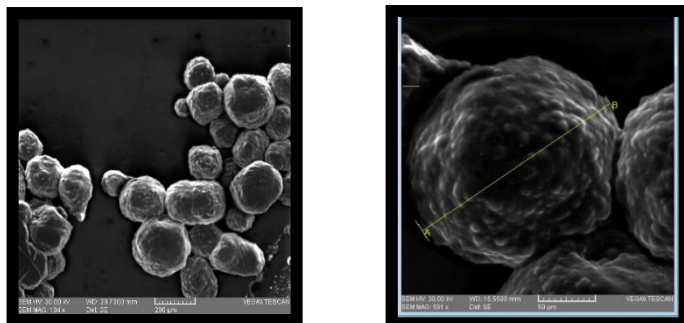


Fig. 2.4 Morfologia microcapsulei cu inulină: a – microcapsule cu 1,5% inulină + 2% alginat; b – microcapsule cu 2% inulină + 2% alginat; c – peretele microcapsulei cu 1,5% inulină + 2% alginat; d – peretele microcapsulei cu 2% inulină + 2% alginat

În procesul de microîncapsulare pentru extrudarea emulsiei au fost utilizate ace de diferite dimensiuni. Pentru început s-au utilizat ace cu un diametru interior de 0,45 mm, apoi s-au utilizat ace cu un diametru interior de 0,40 mm, 0,33 mm și 0,29 mm.



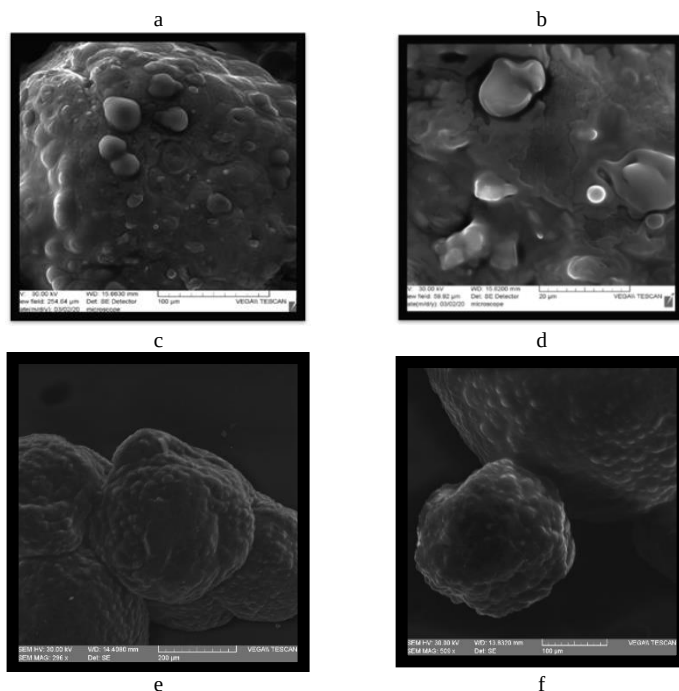


Fig. 2.5. Morfologia microcapsulei cu amidon: a – microcapsule cu 1% amidon + 1,75% alginat; b – microcapsule cu 2% amidon + 2% alginat; c – peretele microcapsulei cu 1% amidon + 1,75% alginat; d – peretele microcapsulei 1% amidon + 1,75% alginat; e – microcapsule cu 2% amidon + 2% alginat; f – microcapsule cu 2% amidon + 2% alginat

Totodată materialele utilizate pentru matricea capsulei au fost testate în diverse concentrații. Pe de o parte concentrația alginatului a fost crescută de la 1% la 1,50 %, 1,75 % și 2%, pe de altă parte concentrația prebioticului de la 1% la 1,5 și respectiv 2 %. Prin creșterile treptate ale concentrațiilor și micșorarea diametrelor de extruziune s-a constatat că dimensiunile microcapsulelor au fost diferite în rândul aceluiași tip de material. S-a observat că mărimea microcapsulelor poate fi influențată de factori precum: concentrația de alginat, concentrația de clorură de calciu, diametrul acului, presiunea pompei, distanța dintre ac și soluția de CaCl_2 , viteza de agitare și de raportul dintre apă și ulei.

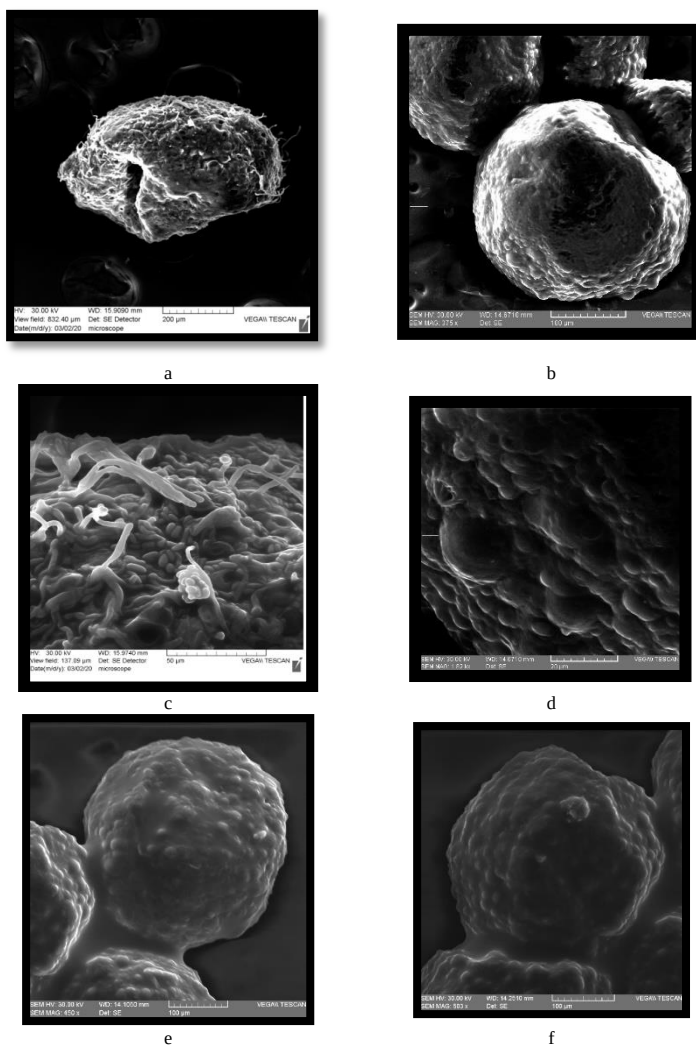


Fig. 2.6 Morfologia microcapsulei cu oligofructoză: a – microcapsule cu 1% oligofructoză + 1% alginat; b – microcapsule cu 1% oligofructoză + 2% alginat; c – peretele microcapsulei cu 1% oligofructoză + 1% alginat; d – peretele microcapsulei 1% oligofructoză + 2% alginat; e – microcapsule cu 2% oligofructoză + 2% alginat; f – microcapsule cu 2% oligofructoză + 2% alginat

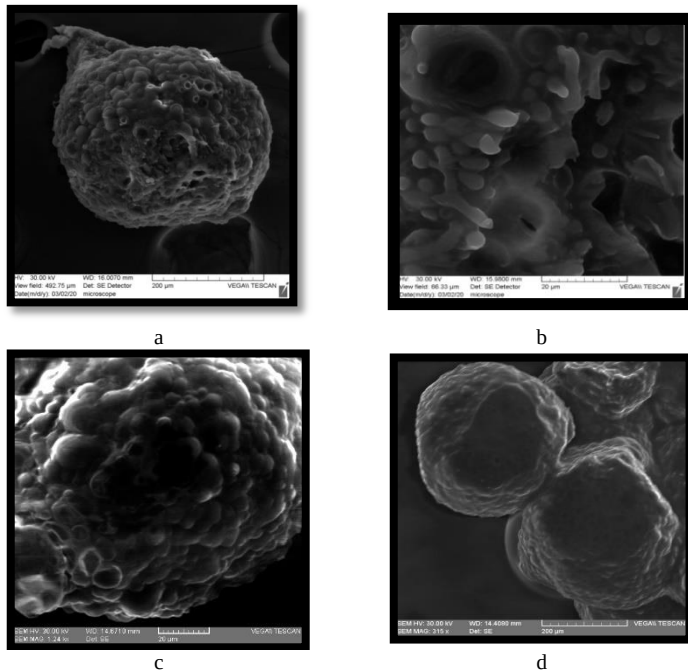
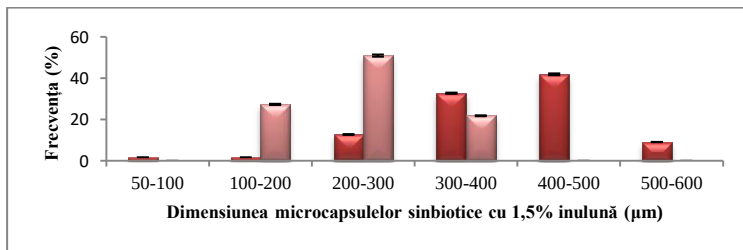


Fig. 2.7. Morfologia microcapsulei cu glucoză: a – microcapsule cu 1% glucoză + 1,75% alginat; b – peretele microcapsulei cu 1% glucoză + 1,75% alginat; c – microcapsule cu 2% glucoză + 2% alginat; d – microcapsule cu 2% glucoză + 2% alginat

Rezultatele obținute în urma evaluării diametrului mediului și distribuției dimensiunii microcapsulelor proaspete dar și a celor supuse acțiunii sucurilor gastric și intestinal, au contribuit la ajustarea concentrațiilor de materiale din matricea de încapsulare.

Histograma din Fig. 2.8 arată faptul că o creștere ușoară a concentrației de prebiotic nu modifică semnificativ dimensiunea microcapsulelor. Același aspect se poate observa și din analiza Tab. 2.3 cu dimensiunile microcapsulelor ce conțin în matricea lor 1,75% alginat și 1% prebiotic.



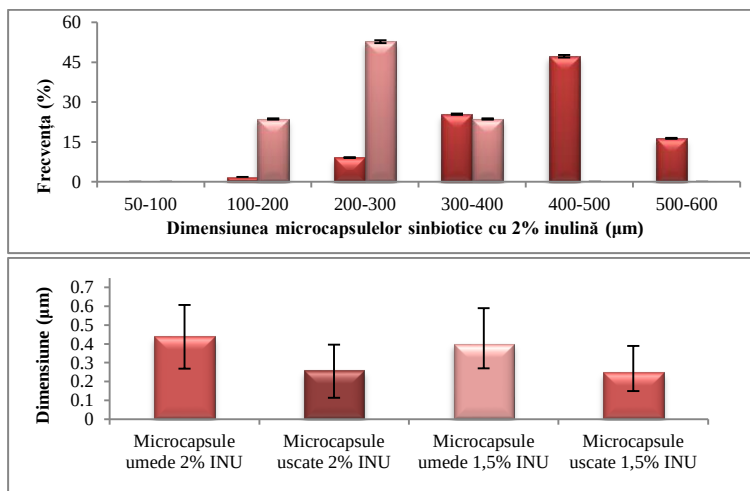


Fig. 2.8. Distribuția dimensiunii microcapsulelor: ■ – microcapsule umede cu 2% și 1,5% inulină; ■ – microcapsule uscate cu 2% și 1,5% inulină. INU – inulină. Fiecare bară prezintă media a trei determinări ± abaterea standard

Tab. 2.3 Dimensiunile microcapsulelor cu 1,75% Alginat + 1 % prebiotic.

Tip de microcapsule	Media (mm)	Abatere standard	Valoare minimă (mm)	Valoare maximă (mm)
OLI umede	0,37	0,09	0,20	0,59
OLI uscate	0,25	0,05	0,15	0,39
OLI 1 h SG	0,36	0,11	0,24	0,52
OLI 1 h SI	0,81	0,19	0,15	1,16
OLI 1+1	0,81	0,19	0,39	1,19
STH umede	0,45	0,10	0,23	0,64
STH uscate	0,29	0,06	0,18	0,44
STH 1 h SG	0,34	0,10	0,16	0,56
STH 1 h SI	0,72	0,17	0,39	1,12
STH 1+1	0,76	0,12	0,51	0,95
G umede	0,36	0,08	0,21	0,54
G uscate	0,22	0,05	0,16	0,35
G 1 h SG	0,36	0,15	0,16	0,89
G 1 h SI	0,50	0,15	0,26	1,05
G 1+1	0,74	0,21	0,40	1,31

OLI – microcapsule sinbiotice cu oligofructoză; STH – microcapsule sinbiotice cu amidon, G – microcapsule sinbiotice cu glucoză; 1 h SG – microcapsule sinbiotice ce au stat 1 h în sucul gastric simulat la 37 °C, 1 h SI – microcapsule sinbiotice ce au stat 1 h în sucul intestinal simulat la 37 °C, 1+1 – microcapsule sinbiotice ce au stat 1 h în sucul gastric, apoi 1 h în sucul intestinal la 37 °C. Valorile reprezintă media a 55 de microcapsule sinbiotice, exprimată în mm.

Ultima parte a acestui capitol cuprinde rezultatele studiilor efectuate asupra influenței diferitelor concentrații din fiecare material în parte din matricea de încapsulare asupra viabilității celulare din microcapsule în funcție de perioada și condițiile de depozitare în medii care simulează *in vitro* sucul gastric și cel intestinal.

Menținerea viabilității celulare în timpul și după procesul de încapsulare reprezintă un factor foarte important, indiferent de tipul tehnicilor de încapsulare utilizate. În tab. 2.4 sunt prezentate rezultatele eficienței încapsulării în funcție de concentrațiile utilizate pentru obținerea matricelor microcapsulelor. În cazul studiului de față, s-a observat că indiferent de concentrațiile utilizate s-au obținut randamente optime de încapsulare pentru toate variantele testate dar cu diferențe semnificative între ele ($p > 0,05$).

Tab. 2.4 Viabilitatea celulară înainte și după încapsulare. Eficiența încapsulării %

Compoziția matricii de încapsulare		Încărcătura probiotică din emulsie	Încărcătura probiotică din microcapsule	Eficiența încapsulării
		$\log_{10}$ ufc/ml	$\log_{10}$ ufc/g	%
1,75% alginat + 1% prebiotic	G	$11,05 \pm 0,98^b$	$11,27 \pm 1,05^a$	$102,01 \pm 2,60^b$
	OLI	$10,92 \pm 1,24^a$	$11,47 \pm 2,01^b$	$105,13 \pm 1,06^c$
	STH	$13,38 \pm 0,34^c$	$14,49 \pm 1,27^d$	$108,30 \pm 1,58^d$
	INU	$13,46 \pm 0,85^d$	$13,48 \pm 0,98^c$	$100,15 \pm 2,14^a$
1,5% alginat + 1,5% prebiotic	INU	$8,75 \pm 1,14^b$	$9,27 \pm 0,66^a$	$106,043 \pm 2,04^b$
	STH	$8,72 \pm 0,43^a$	$9,55 \pm 0,85^b$	$109,55 \pm 2,03^b$
	OLI	$10,95 \pm 1,14^c$	$11,47 \pm 0,05^c$	$105,51 \pm 0,05^b$
	G	$11,05 \pm 0,34^c$	$11,26 \pm 0,15^c$	$102,02 \pm 1,05^a$
1,5% alginat + 2% prebiotic	INU	$16,12 \pm 0,03^a$	$14,58 \pm 0,06^a$	$90,42 \pm 0,14^c$
	INU	$16,45 \pm 0,09^b$	$14,50 \pm 0,04^c$	$88,16 \pm 0,13^c$
2% alginat + 2% prebiotic	OLI	$16,17 \pm 0,05^a$	$14,26 \pm 0,03^b$	$88,19 \pm 0,09^c$
	STH	$16,12 \pm 0,08^a$	$14,03 \pm 0,03^a$	$87,02 \pm 0,12^a$
	G	$16,09 \pm 0,04^a$	$14,09 \pm 0,02^a$	$87,54 \pm 0,11^b$

OLI – microcapsule sinbiotice cu oligofrucoză; STH – microcapsule sinbiotice cu amidon; G – microcapsule sinbiotice cu glucoză; INU – microcapsule sinbiotice cu inulină. Valorile sunt rezultatul a trei determinări și sunt exprimate ca media $\pm$ abaterea standard. Literele mici sunt utilizate pentru a diferenția valorile între rânduri.

Viabilitatea celulelor probiotice microîncapsulate pe perioada depozitării este prezentată în Tab. 2.5. În urma analizelor s-a constatat importanța concentrației de biopolimer dar și de prebiotic în menținerea viabilității celulare ca urmare a procesului de încapsulare dar și ca urmare a perioadelor de depozitare. Valorile obținute pentru viabilitatea celulară din același moment de stocare și același tip de microcapsule au fost analizate statistic și s-a constatat că există diferențe semnificative ($p < 0,05$). Totodată s-au evaluat statistic și toate perechile și asocierile posibile de la același moment de stocare (INU T_0 – G T_0 , INU T_0 – STH T_0 ; INU T_0 – OLI T_0 ; OLI T_0 – STH T_0 ; OLI T_0 – G T_0 ; STH T_0 – G T_0 , urmând T_7 , T_{14} , T_{21} , T_{30} , T_{45}) și bineînțeles și microcapsulele cu matrici diferite. Astfel, încărcătura celulară atât în microcapsulele sinbiotice cu INU (2% alginat + 2% prebiotic), cât și în microcapsulele sinbiotice cu STH (2% alginat + 2% prebiotic) a fost de 9,00 $\log_{10}$ ufc/g, respectiv 8,98 $\log_{10}$ ufc/g. În microcapsulele sinbiotice cu OLI (2% alginat + 2% prebiotic) s-a obținut o încărcătura celulară de 8,33 $\log_{10}$ ufc/g care este foarte apropiată de celelalte două tipuri de microcapsule după 30 de zile de depozitare.

În microcapsule este necesar să existe o încărcătură probiotică suficient de mare astfel încât atunci când acestea ajung la locul de acțiune în intestin să se regăsească în cantitatea optimă pentru o colonizare eficientă.

Rezultatele obținute ca urmare a studiului viabilității celulare în condiții gastrointestinale simulate *in vitro* pentru toate tipurile de microcapsule (2% alginat + 2% prebiotic; 1,5% alginat + 2% prebiotic; 1,75% alginat + 1% prebiotic; 1,5% alginat + 1,5% prebiotic) au arătat și ele importanța compoziției matricei microcapsulelor.

Tab. 2.5. Viabilitate tulpinilor de lactobacili în timpul perioadei de depozitare

		Microcapsule sinbiotice				
Compoziția matricei	Perioada de depozitare (zile)	G	OLI	STH	INU	
		(log ₁₀ ufc/g)	(log ₁₀ ufc/g)	(log ₁₀ ufc/g)	(log ₁₀ ufc/g)	
2% alginat + 2% prebiotic	T ₀	14,08±0,02 ^{eA}	14,25±0,02 ^{dB}	14,03±0,03 ^{dA}	14,50±0,04 ^{cC}	
	T ₇	10,85±0,04 ^{dA}	11,68±0,20 ^{cB}	11,80±0,07 ^{cB}	12,16±0,15 ^d	
	T ₁₄	7,85±0,05 ^{cA}	8,94±0,04 ^{aB}	9,32±0,04 ^{bC}	10,39±0,09 ^{cD}	
	T ₂₁	7,42±0,05 ^{bA}	8,50±0,04 ^{aB}	9,24±0,04 ^{bC}	9,77±0,07 ^{bD}	
	T ₃₀	6,78±0,15 ^{aA}	8,30±0,00 ^{aB}	8,98±0,06 ^{aC}	9,00±0,02 ^{aC}	
1,5% alginat + 2% prebiotic	INU (log ₁₀ ufc/g)					
	T ₀	14,58±0,09 ^d				
	T ₇	11,80±0,17 ^c				
	T ₁₄	8,80±0,17 ^b				
	T ₂₁	7,16±0,15 ^a				
1,75% alginat + 1% prebiotic			STH (log ₁₀ ufc/g)	INU (log ₁₀ ufc/g)		
	T ₀	13,52±0,04 ^{eB}		13,24±0,04 ^{eA}		
	T ₇	11,40±0,01 ^{dA}		11,47±0,02 ^{dB}		
	T ₁₄	9,97±0,02 ^{cA}		10,33±0,03 ^{cB}		
	T ₂₁	7,90±0,09 ^{bA}		9,53±0,13 ^{bB}		
	T ₃₀	7,23±0,03 ^{aA}		8,23±0,03 ^{aB}		
1,5% alginat + 1,5% prebiotic			OLI (log ₁₀ ufc/g)	G (log ₁₀ ufc/g)	STH (log ₁₀ ufc/g)	INU (log ₁₀ ufc/g)
	T ₀	11,47±0,05 ^{eD}		11,26±0,10 ^{eC}		9,55 ±0,2 ^{cB}
	T ₇	9,56±0,10 ^{dC}		8,36±0,10 ^{dA}		9,23±0,04 ^{cB}
	T ₁₄	9,49±0,11 ^{dC}		6,37±0,10 ^{cA}		9,13±0,05 ^{bB}
	T ₂₁	7,01±0,25 ^{cB}		4,01±0,13 ^{bA}		7,63±0,01 ^{aD}
	T ₃₀	6,23±0,21 ^{bB}		3,54±0,47 ^{bA}		
	T ₄₅	5,52±0,27 ^{aB}		2,65±0,16 ^{aA}		

OLI – microcapsule sinbiotice cu oligofructoză; STH – microcapsule sinbiotice cu amidon; G – microcapsule sinbiotice cu glucoză; INU – microcapsule sinbiotice cu inulină. Valorile sunt în log₁₀ ufc/g și reprezintă rezultatul a trei determinări, fiind exprimate ca valoarea medie ± abaterea standard, litere mici sunt folosite pentru a diferenția valorile între rânduri, în timp ce litere mari pentru a diferenția valorile dintre coloane ($p < 0,05$).

Astfel, în urma experimentelor s-a observat importanța concentrației de prebiotic dar și a celei de biopolimer pentru menținerea unei viabilități celulare ridicate. Rezultatele viabilității celulare obținute ca urmare a acțiunii sucurilor gastrointestinale simulate *in vitro* atât după procesul de microîncapsulare cât și pe parcursul depozitării refrigerate timp de 30 de zile la 4 °C din microcapsulele ce au în matricea lor 2% alginat și 2% prebiotic sunt redată în Fig. 2.9.

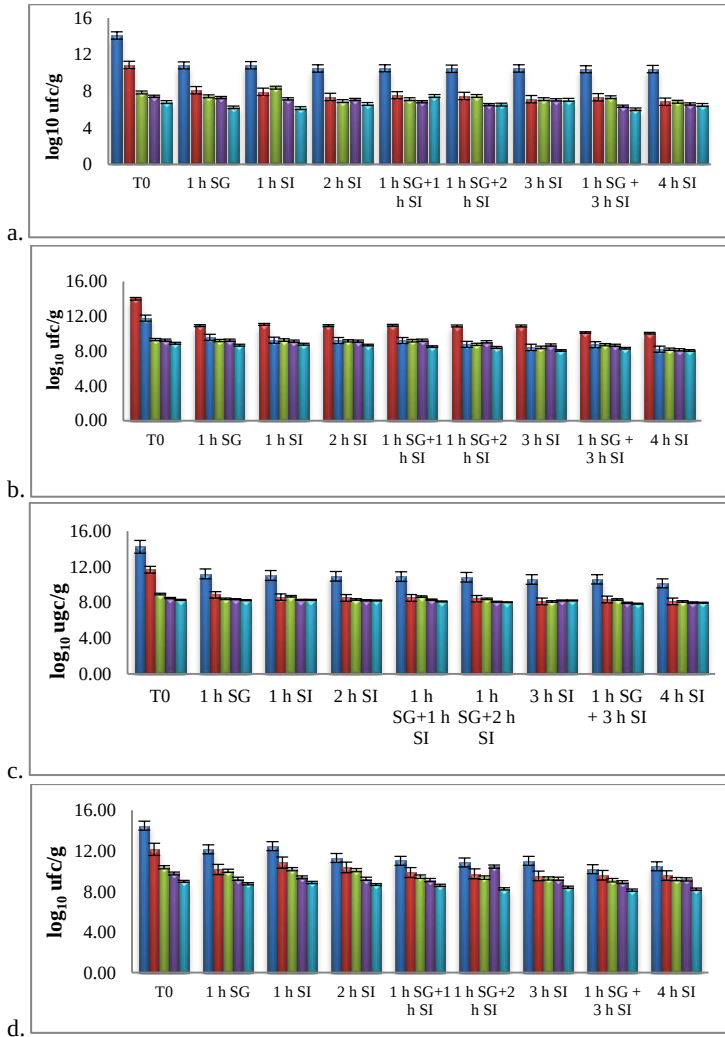


Fig. 2.9. Viabilitatea celulară în sucurile gastrointestinale simulate pentru microcapsulele sinbiotice cu 2% alginat + 2% prebiotic (a - glucoză, b - amidon, c - oligofructoză și d - inulina). 1 h SG – viabilitatea în microcapsule ce au stat o oră în sucul gastric simulat la 37 °C, 1 h SI – viabilitatea în microcapsule ce au stat 1 h (2 h, 3 h și 4 h) în sucul intestinal simulat la 37 °C, 1 h SG + 1 h SI (2 h SI și 3 h SI) – viabilitatea în microcapsule ce au stat 1 h (2, respectiv 3 h) în sucul gastric, apoi 1 h în sucul intestinal la 37 °C. ■ – T₀, ■ – T₇, ■ – T₁₄, ■ – T₂₁ și ■ – T₃₀ – momentele de analiză în funcție de zilele de depozitare ale microcapsulelor raportate la ziua microîncapsulării. Fiecare bară prezintă media a trei determinări ± abaterea standard

S-a observat că cea mai bună formulă din cele testate pentru a oferi protecția celulară cea mai eficientă în timpul procesului tehnologic de obținere a microcapsulelor, în timpul depozitării în condiții de refrigerare dar și în urma acțiunii sucurilor gastrointestinale simulate este cea care conține 2% prebiotic și 2% alginat. Aceste valori indică faptul că concentrațiile surselor de carbon utilizate pentru menținerea unei viabilități ridicate au atins obiectivele urmărite. S-a constatat că, după acțiunea sucurilor gastro-intestinale, viabilitatea celulară se încadrează în limitele recomandate de Organizația pentru Alimentație și Agricultură a Organizației Națiunilor Unite (FAO). Prin urmare, concentrația de 2% atât pentru prebiotic cât și pentru alginat, precum în cazul de față: a inulinei de 2% în microcapsule, a fost cea mai eficientă pentru menținerea viabilității celulare în condiții gastrice simulate pe o perioadă de depozitare de 30 de zile.

Odată cu dezvoltarea formulei optime s-a reușit dezvoltarea unui sistem de microîncapsulare pornind de la concentrațiile diferitelor ingrediente, dimensiunile și diametrele acelor până la distanța și viteza de picurare și verificarea viabilității în sucurile digestive simulate. Cu ajutorul sistemului implementat a fost posibilă obținerea microcapsulelor sinbiotice cu dimensiuni de ordinul sutelor de micrometri (200-450 μm), a formelor acestora cu preponderență sferice, a unei eficiențe de microîncapsulare mult ridicată raportate la tehnica utilizată și la dimensiunile obținute. Totodată, rezultatele au arătat faptul că procesul de microîncapsulare ales și noul sistem tehnologic dezvoltat nu este responsabil pentru scăderea viabilității celulare.

S-a putut demonstra că menținerea viabilității celulelor probiotice microîncapsulate în matrici de alginat-prebiotic s-a putut menține mult peste nivelul minim recomandat (10^6 - 10^7 ufc/g) în timpul procesului tehnologic de obținere a microcapsulelor, în timpul depozitării în condiții de refrigerare timp de 30 de zile dar și în urma acțiunii *in vitro* a sucurilor gastrointestinale simulate după cele 30 de zile de depozitare.

Capitolul III „Cercetări privind utilizarea microcapsulelor Sinbiotice în iaurt”, prezintă datele experimentale obținute cu scopul de a verifica eficiența matricei de microîncapsulare având în vedere menținerea viabilității culturilor probiotice încapsulate și inoculate în iaurt, cât și studierea proprietăților fizico-chimice, reologice și de textură a acestuia. În acest capitol s-a urmărit: studierea evoluției viabilității celulare din microcapsulele sinbiotice după inocularea acestora în iaurt, urmată de determinarea proprietăților fizico-chimice (pH și aciditate titrabilă), caracteristicilor reologice și caracteristicilor de textură (duritate, coezivitate, adezivitate și elasticitate) ale iaurtului cu microcapsule sinbiotice prin comparare cu un iaurt simplu. Datele experimentale au vizat totodată și determinarea eficienței matricei de încapsulare în menținerea viabilității celulelor probiotice ca urmare a acțiunii *in vitro* a sucurilor gastrointestinale asupra microcapsulelor sinbiotice din iaurt. Cercetările prezentate în

capitolul de față au fost efectuate atât pe produsul finit, inițial, cât și la intervale de 7 zile pe o perioadă de 21 de zile de depozitare.

Rezultatele experimentale cu privire la eficiența prebioticelor din matricea de încapsulare a probioticelor în menținerea unei viabilități celulare ridicate în timpul procesului de obținere a iaurtului dar și în timpul depozitării acestuia sunt prezentate în tab. 3.1.

Tab. 3.1. Viabilitatea celulară în iaurt

	Perioada de depozitare (zile)	Viabilitate celulară în funcție de tipul de iaurt ($\log_{10}$ ufc/g)		
		I M	I STH	I INU
Stabilitate	T ₀	8,25 ± 0,02 ^{dA}	10,44 ± 0,02 ^{dB}	10,59 ± 0,02 ^{cC}
	T ₇	7,98 ± 0,07 ^{cA}	10,02 ± 0,05 ^{CB}	10,63 ± 0,06 ^{cC}
	T ₁₄	7,82 ± 0,02 ^{bA}	9,80 ± 0,03 ^{bB}	10,38 ± 0,13 ^{cC}
	T ₂₁	7,10 ± 0,17 ^{aA}	9,53 ± 0,12 ^{aB}	9,87 ± 0,19 ^{cC}
1 h în suc gastric	T ₀	5,90 ± 0,04 ^{bA}	7,91 ± 0,04 ^{CB}	8,29 ± 0,05 ^{cC}
	T ₇	6,47 ± 0,15 ^{cA}	8,46 ± 0,06 ^{dB}	8,84 ± 0,09 ^{cC}
	T ₁₄	5,90 ± 0,13 ^{bA}	7,05 ± 0,02 ^{aB}	7,93 ± 0,03 ^{cC}
	T ₂₁	5,87 ± 0,11 ^{aA}	7,28 ± 0,15 ^{bB}	7,84 ± 0,05 ^{cC}
1 h în suc intestinal	T ₀	5,77 ± 0,03 ^{bA}	7,74 ± 0,02 ^{bB}	7,99 ± 0,06 ^{cC}
	T ₇	6,26 ± 0,20 ^{cA}	8,37 ± 0,15 ^{dB}	8,30 ± 0,12 ^{cC}
	T ₁₄	5,74 ± 0,15 ^{bA}	7,63 ± 0,04 ^{aB}	8,08 ± 0,08 ^{bc}
	T ₂₁	5,50 ± 0,08 ^{aA}	8,13 ± 0,05 ^{cB}	8,07 ± 0,09 ^{bB}

I M – iaurt fără microcapsule sinbiotice (probă martor); I STH – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu amidon; I INU – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu inulină. Valorile sunt în $\log_{10}$ ufc/g și reprezintă rezultatul a trei determinări, fiind exprimate ca valoare medie ± abaterea standard. Litere mici sunt utilizate pentru a diferenția valorile între rânduri, în timp ce indicii cu litere mari pentru a diferenția valorile între coloane.

Datele au arătat că procesul de microîncapsulare a asigurat protecția tulpinilor probiotice microîncapsulate în timpul procesului tehnologic de obținere al iaurtului iar materialele din matricea capsulei au menținut viabilitatea celulară. Acest aspect este foarte important întrucât tulpinile probiotice adăugate în alimente trebuie să-și mențină viabilitatea celulară într-un procent suficient pentru a oferi beneficii pentru sănătate consumatorilor (Thomas, 2016). După perioada de depozitare viabilitatea celulară din toate cele trei tipuri de iaurt, după 21 de zile a fost peste 10^6 – 10^7 $\log_{10}$ ufc/g chiar și după ce au fost supuse acțiunii sucurilor gastrice și intestinale *in vitro*. Astfel, după cele 21 de zile de depozitare a iaurturilor s-a observat o rată a viabilității celulare ridicată, pentru iaurtul I STH rata de viabilitate față de T₀ a fost de $91,22 \pm 0,12\%$, iar concentrație celulară a fost de $9,53 \pm 0,12$ $\log_{10}$ ufc/g. Rata de viabilitate celulară față de T₀ pentru I INU a fost de $93,27 \pm 0,04\%$ cu o concentrație celulară de $9,87 \pm 0,19$ $\log_{10}$ ufc/g. Prin urmare, compoziția matricei microcapsulelor sinbiotice, prebioticele alese și procesul de microîncapsulare au asigurat protecția celulelor de *L. casei*, *L. plantarum* și *L. rhamnosus* în timpul depozitării iaurtului timp de 21 de zile în condiții de refrigerare.

Viabilitatea celulară din interiorul microcapsulelor, după acțiunea *in vitro* a sucurilor gastric ($7,28 \pm 0,15$ $\log_{10}$ ufc/g - I STH, $7,84 \pm 0,05$ $\log_{10}$ ufc/g - I INU) și intestinal ($8,13 \pm 0,05$ $\log_{10}$ ufc/g- I STH, $8,07 \pm 0,09$

$\log_{10}$ ufc/g – I INU) a fost peste limitele minime menționate de FAO/OMS (10^6 - 10^7 ufc/g) ceea ce recomandă utilizarea iaurtului ca matrice alimentară pentru microcapsulele sinbiotice.

Produsele obținute au îndeplinit caracteristicile de calitate specificate în legislația în vigoare. Având în vedere că nu au fost înregistrate modificări semnificative între proba martor de iaurt și probele de iaurt cu adaos de probiotice, s-a demonstrat ca această tehnologie de microîncapsulare prezintă numeroase avantaje pentru producția industrială în masă a iaurturilor cu adaos de probiotice microîncapsulate.

Menținerea viabilității celulare în produsele alimentare funcționale este importantă deoarece aceasta joacă un rol important în asigurarea beneficiilor asupra sănătății. În studiul de față s-a evaluat efectul formulei matricei microcapsulelor asupra viabilității celulare, dar și asupra proprietăților fizico-chimice ale iaurturilor obținute cu adaos de prebiotice și probiotice microîncapsulate.

Datele experimentale au demonstrat că microcapsulele sinbiotice adăugate în iaurt nu au modificat parametrii fizico-chimici analizați (pH și aciditate titrabilă) în timpul procesului tehnologic de obținere a alimentului. Activitatea metabolică din microcapsulele sinbiotice prezente în produsul finit nu a produs modificări ale parametrilor fizico-chimici analizați pe perioada de depozitare.

Analiza caracteristicilor fizico-chimice ale iaurtului cu microcapsule sinbiotice efectuată în urma procesului tehnologic de obținere, a arătat că prezența acestora nu a modificat proprietățile chimice față de cele ale unui iaurt tradițional. Datele experimentale în ceea ce privește evoluția acidității titrabile și a pH-ului în timpul depozitării se regăsesc în Tab. 3.1 și 3.2.

Tab. 3.1. Modificări ale pH-ului iaurturilor în timpul perioadei de depozitare

Perioada de depozitare (zile)	Valorile pH-ului în funcție de tipul de iaurt		
	I INU	I STH	I M
T ₀	4,59 ± 0,02 ^{CA}	4,66 ± 0,00 ^{dB}	4,62 ± 0,01 ^{dA}
T ₇	4,28 ± 0,02 ^{bA}	4,35 ± 0,00 ^{CB}	4,30 ± 0,01 ^{CA}
T ₁₄	4,11 ± 0,01 ^{aA}	4,21 ± 0,01 ^{bB}	4,20 ± 0,01 ^{CB}
T ₂₁	4,10 ± 0,00 ^{aA}	4,18 ± 0,00 ^{aB}	4,22 ± 0,00 ^{aC}

I M – iaurt fără microcapsule sinbiotice (probă martor); I STH – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu amidon; I INU – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu inulină. Valorile sunt rezultatul a trei determinări și sunt exprimate ca valoare medie ± abaterea standard. Literele mici sunt utilizate pentru a diferenția valorile între rânduri, în timp ce literele mari pentru a diferenția valorile între coloane.

Tab. 3.2 Valorile acidității titrabile în probele de iaurt

Tip de iaurt	Aciditate titrabilă (°T)			
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁
I INU	70,00 ± 0,00 ^{bA}	76,40 ± 2,38 ^{bB}	87,04 ± 1,05 ^{bC}	89,06 ± 0,50 ^{bD}
I STH	70,01 ± 0,01 ^{bA}	76,82 ± 3,90 ^{bB}	88,19 ± 0,80 ^{cD}	83,95 ± 0,61 ^{aC}
I M	65,00 ± 4,50 ^{aA}	74,08 ± 1,06 ^{aB}	81,49 ± 1,91 ^{aC}	83,96 ± 0,48 ^{aD}

I M – iaurt fără microcapsule sinbiotice (probă martor); I STH – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu amidon; I INU – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu inulină. Valorile sunt rezultatul a trei determinări și sunt exprimate ca valoare medie ± abaterea standard. Literele mici sunt utilizate pentru a diferenția valorile între rânduri, în timp ce literele mari pentru a diferenția valorile între coloane.

Valorile parametrilor de textură și parametrilor reologici analizați în cazul iaurturilor cu adaos de microcapsule sinbiotice nu diferă semnificativ de valorile obținute în cazul probei martor, reprezentată de iaurt simplu, fără microcapsule. Impactul microcapsulelor sinbiotice asupra texturii iaurtului probiotic atât după obținerea acestuia cât și în perioada de depozitare se poate observa în Tab. 3.3.

Tab. 3.3. Evoluția în timp a caracteristicilor de textură a iaurtului

Parametru de textură	Perioada de depozitare (zile)	Tip de iaurt		
		I M	I STH	I INU
Duritate (g)	T ₀	18,00 ± 0,12 ^{ab}	16,00 ± 0,04 ^{aA}	16,00 ± 0,04 ^{aA}
	T ₇	21,50 ± 0,06 ^{bb}	21,00 ± 0,14 ^{bA}	21,50 ± 0,24 ^{bB}
	T ₁₄	22,04 ± 0,48 ^{cA}	22,00 ± 0,18 ^{cA}	22,58 ± 0,20 ^{cB}
	T ₂₁	22,50 ± 0,05 ^{cA}	23,50 ± 0,24 ^{dB}	25,00 ± 0,12 ^{dC}
Coezivatitate	T ₀	0,83 ± 0,09 ^{aB}	0,79 ± 0,03 ^{aA}	0,80 ± 0,12 ^{aB}
	T ₇	0,86 ± 0,03 ^{aB}	0,84 ± 0,02 ^{bA}	0,94 ± 0,01 ^{bC}
	T ₁₄	0,91 ± 0,03 ^{bB}	0,88 ± 0,03 ^{cA}	0,94 ± 0,03 ^{bC}
	T ₂₁	0,85 ± 0,03 ^{aA}	0,88 ± 0,03 ^{cA}	0,98 ± 0,03 ^{bB}
Adezivatitate (J)	T ₀	23,48 ± 0,93 ^{aC}	4,22 ± 0,16 ^{aA}	6,86 ± 0,27 ^{aB}
	T ₇	49,24 ± 0,96 ^{bb}	41,38 ± 0,65 ^{aA}	56,68 ± 0,26 ^{bC}
	T ₁₄	58,84 ± 0,30 ^{cB}	49,22 ± 0,96 ^{cA}	64,53 ± 0,58 ^{cC}
	T ₂₁	53,56 ± 0,84 ^{dA}	54,51 ± 0,08 ^{dA}	80,93 ± 0,20 ^{dB}

I M – iaurt fără microcapsule sinbiotice (probă martor); I STH – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu amidon; I INU – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu inulină. Valorile sunt rezultatul a trei determinări și sunt exprimate ca valoare medie ± abaterea standard. Literele mici sunt utilizate pentru a diferenția valorile între rânduri, în timp ce literele mari pentru a diferenția valorile între coloane.

Rezultatele obținute, raportate la valorile probei martor, atestă faptul că prezența microcapsulelor nu a produs modificări în textura iaurtului. În schimb, se observă o îmbunătățire a valorilor durității tuturor probelor pe parcursul perioadei de depozitare de 21 zile, ca urmare a activității metabolice a culturii starter. Rezultatele obținute confirmă eficiența microcapsulelor sinbiotice, produșii de metabolism ai lactobacililor încapsulați nu au afectat activitatea celulelor starter și implicit nici textura produselor alimentare.

Analiza parametrilor reologici ale probelor de iaurt luate în studiu (Tab. 3.4) au arătat o valoare a lui G' (modulul de elasticitate) mai mare decât valoarea lui G'' (modulul de vâscozitate) în timpul variației frecvenței. Aceasta a demonstrat comportamentul reologic de tip gel, asemănător pentru toate probele. Valorile G' și G'' corespunzătoare iaurtului martor au fost mai mici decât iaurturile ce conțin microcapsule cu inulină și cele cu amidon până la T₁₄. Proprietățile elastice și vâscoase reduse ar putea fi cauzate de îmbunătățirea rețelelor de micle proteice ale iaurtului cu microcapsule. G' a crescut pentru toate tipurile de iaurt pe parcursul a 14 zile de depozitare, ceea ce arată că probele au suferit o scădere a valorii pentru componenta elastică. În ziua 21 s-a observat o scădere semnificativă față de ziua 14, ceea ce arată că vâscozitatea iaurturilor I INU și I STH s-a redus. Ca urmare acestea prezintă o capacitate scăzută de reținere a zerului.

Toate probele de iaurt au prezentat o vâscozitate ridicată la momentul T_0 față de T_{21} .

Adăugarea microcapsulelor sinbiotice provoacă o ușoară scădere a vâscozității în comparație cu iaurtul clasic. Prin urmare, adaosul de inulină și amidon îmbunătățește atât structura rețelei, cât și permeabilitatea coagului și reduce procesul de sinereză în cele 21 de zile de depozitare.

Tab. 3.4. Evoluția parametrilor vâscoelastici pe perioada de depozitare la frecvența de 1 Hz

Perioada de depozitare (zile)	Tip de iaurt	G' (Pa)	G'' (Pa)
T_0	I M	$31,23 \pm 1,24^{aB}$	$10,81 \pm 0,43^{aA}$
	I INU	$200,00 \pm 8,00^{bB}$	$43,99 \pm 1,75^{bA}$
	I STH	$232,00 \pm 9,28^{cB}$	$50,39 \pm 2,01^{cA}$
T_7	I M	$38,37 \pm 1,53^{aB}$	$11,22 \pm 0,44^{aA}$
	I INU	$144,5 \pm 5,78^{bB}$	$33,38 \pm 1,33^{bA}$
	I STH	$268,2 \pm 10,72^{cB}$	$60,45 \pm 2,41^{cA}$
T_{14}	I M	$56,49 \pm 2,25^{aB}$	$15,41 \pm 0,61^{aA}$
	I INU	$216,75 \pm 8,67^{bB}$	$56,25 \pm 2,25^{bA}$
	I STH	$311,00 \pm 12,44^{cB}$	$78,37 \pm 3,13^{cA}$
T_{21}	I M	$83,50 \pm 3,34^{aB}$	$25,12 \pm 1,00^{aA}$
	I INU	$146,20 \pm 5,84^{bB}$	$34,30 \pm 1,37^{bA}$
	I STH	$123,02 \pm 4,92^{bB}$	$59,56 \pm 2,38^{cA}$

I M – iaurt fără microcapsule sinbiotice (probă martor); I STH – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu amidon; I INU – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu inulină. G' – modulul de elasticitate, G'' – modulul de vâscozitate. Valorile sunt rezultatul a trei determinări și sunt exprimate ca valoare medie $\pm$ abaterea standard. Literele mici sunt utilizate pentru a diferenția valorile între rânduri, în timp ce literele mari pentru a diferenția valorile între coloane.

Asemănările dintre valorile parametrilor fizico-chimici ale cele două tipuri de iaurturi ne indică faptul că iaurtul ce conține microcapsule sinbiotice este un produs ce poate fi acceptat cu ușurință de către consumatori. Produsele obținute au îndeplinit caracteristicile de calitate specificate în legislația în vigoare. Având în vedere că nu au fost înregistrate modificări semnificative între proba martor de iaurt și probele de iaurt cu adaos de probiotice, s-a demonstrat că această tehnologie de microîncapsulare prezintă numeroase avantaje pentru producția industrială în masă a iaurturilor cu adaos de probiotice microîncapsulate.

Capitolul IV al tezei „Cercetări privind utilizarea probioticelor microîncapsulate în iaurt vegetal din lapte de ovăz” prezintă dezvoltarea unui produs alimentar pe bază de ovăz: iaurt de ovăz îmbogățit cu microcapsule sinbiotice. În acest capitol sunt prezentate rezultatele experimentale privind dezvoltarea iaurtului din lapte de ovăz cu microcapsule sinbiotice și verificarea eficacității materialelor matricei de încapsulare cu privire la menținerea viabilității celulare din toate tipurile de microcapsule după procesul tehnologic de obținere al iaurtului, după acțiunea sucurilor digestive și în timpul perioadei de depozitare a iaurtului timp de 28 de zile. În cadrul studiului au fost investigate: efectul inoculării microcapsulelor sinbiotice asupra caracteristicilor senzoriale, parametrilor

reologici și de textură ale iaurtului din lapte de ovăz, proprietăților fizico-chimice (pH și aciditate titrabilă), profilului de aminoacizi și acizi organici.

Având în vedere necesitatea unor produse alimentare funcționale care nu sunt pe bază de lactate, studiul de față a fost realizat pentru a obține un iaurt din lapte de ovăz îmbogățit cu microcapsulele sinbiotice studiate – microcapsule cu Fibruline®DS2 – 98% inulină din cicoare, microcapsule cu oligofructoză, microcapsule cu amidon din cartofi și microcapsule cu glucoză. Acest tip de produs sinbiotic ar reprezenta un element de noutate în industria alimentară. Prin urmare, au fost dezvoltate 5 tipuri de iaurt, dintre care unul fără microcapsule sinbiotice. Produsele au fost studiate din punct de vedere senzorial de către un grup de degustători, din punct de vedere al proprietăților fizico-chimice (aciditate titrabilă, pH, culoare), reologice și de textură. Ulterior, iaurturile au fost analizate și din punct de vedere al profilului de aminoacizi liberi și de acizi organici. Avantajele funcționale ale produselor și implicit al culturilor probiotice microîncapsulate au fost studiate prin analiza viabilității celulare din microcapsulele sinbiotice pe perioada de depozitare, prin analiza viabilității celulare ca urmare a acțiunii *in vitro* a sucului gastric și intestinal asupra iaurturilor imediat după producerea lor și pe perioada depozitării (28 de zile la 4 °C).

Rezultatele viabilității celulare din toate tipurile de microcapsule din produsul finit, inițial și din perioada de depozitare la 4 °C timp de 28 de zile se regăsesc în tab. 4.1. Datele experimentare obținute au arătat faptul că rata de viabilitate celulară în celelalte tipuri de microcapsule depinde de complexitatea stucturii chimice a sursei de carbon. Astfel, pentru microcapsulele sinbiotice cu oligofructoză în matricea capsulei, viabilitatea celulară a fost de $9,92 \pm 0,03 \log_{10}$ ufc/g iaurt cu o rată de $90,84 \pm 0,01\%$, urmată de microcapsulele sinbiotice cu amidon $9,83 \pm 0,10 \log_{10}$ ufc/g ($96,86 \pm 0,08\%$) și apoi cele cu inulină $10,00 \pm 0,04 \log_{10}$ ufc/g ($90,52 \pm 0,01\%$). Viabilitatea celulară din microcapsulele sinbiotice cu inulină a fost cea mai ridicată dintre toate tipurile de iaurt cu microcapsule sinbiotice analizate. Rata viabilității celulare în iaurtul din lapte de ovăz fără microcapsule sinbiotice a fost de peste 100% chiar și după 14 zile de depozitare, ceea ce denotă că iaurtul este o sursă nutritivă pentru celulele starter. După cele 28 de zile încărcătura celulară a fost de $7,94 \pm 0,05 \log_{10}$ ufc/g cu o rată de $89,34 \pm 0,01\%$ față de T_0 .

Din datele experimentale obținute s-a observat că, noul produs alimentar poate fi o matrice alimentară potrivită pentru cele trei tulpini probiotice microîncapsulate, indiferent de tipul matricei de încapsulare (INU, OLI, STH și G). Rețeta propusă pentru matricea de microîncapsulare a tulpinilor probiotice este eficientă în ceea ce privește menținerea viabilității celulare în timpul procesului tehnologic de obținere al iaurtului din lapte de ovăz.

Rezultatele viabilității celulare din microcapsulele sinbiotice inoculate în cele 4 tipuri de iaurt sunt redată în Tab. 4.1. Rata de supraviețuire cea mai mică după acțiunea sucului gastric simulat *in vitro* a fost înregistrată în microcapsulele cu glucoză urmate de cele cu OLI, STH și INU.

Tab. 4.1. Viabilitatea celulară din probele de iaurt din lapte de ovăz. Valorile medii și abaterea standard

Parametru	Perioada de depozitare (zile)							Valoare F		Tip de iaurt					Valoare F	
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈	F		F		IM	IG	INU	OLI	ISTH	F	
Viabilitatea celulară (log ₁₀ ufc/g iaurt)	10,30± 0,81 ^b	10,10± 0,77 ^{ab}	9,72± 0,56 ^{ab}	9,56± 0,57 ^a	9,39± 0,80 ^a	4,21**		4,21**		8,70± 0,42 ^a	9,64± 0,56 ^b	10,59± 0,56 ^d	10,12± 0,41 ^c	10,02± 0,21 ^{bc}	36,29***	
Rata de viabilitate (%)	100,00± 0,00 ^c	97,77± 0,00 ^{bc}	94,48± 5,21 ^{ab}	93,29± 4,63 ^a	91,10± 3,71 ^a	10,26***		10,26***		98,06± 4,98 ^c	90,80± 5,50 ^a	96,60± 0,70 ^{bc}	92,68± 3,80 ^{ab}	98,50± 2,14 ^c	9,07***	
Reducerea viabilității celulare raportate la T ₀	0,00± 0,00 ^c	0,22± 0,59 ^{bc}	0,59± 0,45 ^{ab}	0,74± 0,49 ^a	0,91± 0,39 ^a	11,39***		11,39***		0,17± 0,40 ^c	0,91± 0,61 ^a	0,40± 0,53 ^{bc}	0,79± 0,41 ^{ab}	0,19± 0,18 ^c	8,59***	
Viabilitatea celulară în suc gastric (log ₁₀ ufc/g iaurt)	8,99± 0,49 ^a	9,22± 0,52 ^a	9,06± 0,53 ^a	8,97± 0,57 ^a	8,85± 0,48 ^a	1,03ns		1,03ns		8,25± 0,24 ^a	8,72± 0,26 ^b	9,56± 0,22 ^d	9,32± 0,12 ^c	9,23± 0,26 ^c	78,47***	
Rata de viabilitate celulară în suc gastric raportat la viabilitatea celulară inițială din T ₀ din iaurt (%)	87,47± 3,92 ^a	91,43± 3,18 ^b	93,21± 2,79 ^b	93,86± 3,04 ^b	94,54± 3,64 ^b	10,80***		10,80***		95,00± 4,21 ^b	90,58± 4,25 ^a	90,44± 3,97 ^a	92,26± 3,92 ^{ab}	92,23± 2,94 ^{ab}	3,33ns	
Viabilitatea celulară în suc intestinal (log ₁₀ ufc/g iaurt)	9,21± 0,60 ^a	9,45± 0,67 ^a	9,17± 0,48 ^a	8,94± 0,71 ^a	8,96± 0,38 ^a	1,95ns		1,95ns		8,321± 0,2 ^a	8,83± 0,37 ^b	9,79± 0,28 ^d	9,49± 0,14 ^{cd}	9,30± 0,40 ^c	56,06***	
Rata de viabilitate celulară în suc intestinal, raportată la viabilitatea inițială din T ₀ din iaurt (%)	89,57± 2,97 ^a	93,58± 2,18 ^b	94,37± 2,36 ^b	93,42± 2,99 ^b	95,79± 5,12 ^b	7,34***		7,34***		95,78± 5,25 ^b	91,68± 3,51 ^a	92,52± 2,38 ^{ab}	93,89± 3,55 ^{ab}	92,87± 2,90 ^{ab}	2,77ns	

ns - nesemnificativ ($p > 0,05$), * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

^{a-d} - litere diferite din același rând indică diferențe semnificative între probe ($p < 0,001$)

I M – iaurt fără microcapsule sinbiotice (probă martor); I STH – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu amidon; I INU – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu inulină; I G – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu glucoză; I OLI – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu oligofructoză.

S-au înregistrat diferențe semnificative din punct de vedere statistic între toate valorile ($p < 0,05$). Datele experimentale obținute după cele 28 de zile de depozitare au arătat că toate valorile s-au încadrat în limitele recomandate de FAO/OMS (2003). Rezultatele obținute au indicat faptul că ovăzul este un substrat optim pentru creșterea tulpinilor celulare datorită prezenței componentelor nedigerabile care pot fi, de asemenea utilizate ca prebiotice (Kedia et al., 2008) și datorită viabilității celulare peste limita minimă recomandată.

În a doua parte sunt redată rezultatele studiilor experimentale privind efectul inoculării microcapsulelor probiotice asupra calităților organoleptice, caracteristicilor reologice și de textură ale iaurtului din lapte de ovăz, asupra proprietăților fizico-chimice (pH-ul, aciditatea titrabilă, culoare), dar și asupra profilului de aminoacizi și acizi organici.

În cadrul acestui studiu s-au analizat parametrii de culoare ai probelor, prin utilizarea coordonatelor CIEL*, a* și b*, pe toată perioada de depozitare. Valorile parametrilor de culoare (L*, a* și b*) obținute pentru toate probele de iaurt se regăsesc în Tab. 4.2. Datele experimentale au arătat că adăugarea microcapsulelor a produs modificări ale culorii iaurturilor față de proba de martor, însă aceste diferențe nu sunt detectate de ochiul uman deoarece valoarea $\Delta E^* < 3$ (Bernat et al., 2015; Francis, 1983). După 28 de zile de depozitare, culoarea cea mai deschisă pentru iaurt a fost observată la proba cu microcapsule sinbiotice cu amidon ($\Delta L^* = 0,95$), comparativ cu proba martor.

Datele experimentale obținute în urma analizei evoluției acidității titrabile și a pH-ului celor cinci tipuri de iaurt vegetal sunt prezentate în Tab. 4.2. După cele 16 h de fermentație, valorile pH-lui au variat semnificativ pentru toate probele de iaurt în comparație cu proba martor ($p < 0,001$). Valorile s-au încadrat între $3,53 \pm 0,01$ și $3,82 \pm 0,01$, valoarea cea mai mică fiind pentru proba de iaurt I INU. După cele 28 de zile de depozitare dintre toate probele de iaurt analizate s-a observat că cele mai mici valori ale pH-ului s-au obținut pentru proba de iaurt I INU ($3,55 \pm 0,10$). Conform datelor obținute, prezența microcapsulelor, dar și compoziția matricelor acestora au influențat pH-ul iaurturilor, ca urmare a unei viabilități celulare crescute din cultura starter pe toată durata depozitării.

Rezultatele obținute referitor la evoluția acidității titrabile au arătat că în probele de iaurt o creștere a acestui parametru pe parcursul perioadei de depozitare. Astfel, după cele 28 de zile de depozitare, aciditatea titrabilă față de momentul T_0 a crescut cu 58,95% în iaurtul I M, cu 44,12% în iaurtul I INU, cu 44,91% în iaurtul I OLI, cu 41,30% în iaurtul I STH și cu 40,10 % în iaurtul I G. Proba de iaurt I M a avut aciditatea titrabilă cea mai scăzută ($20,27 \pm 0,88$ °T), urmată apoi de cea a iaurtului cu microcapsule sinbiotice cu inulină ($27,00 \pm 0,53$ °T), amidon ($27,29 \pm 2,02$ °T), glucoză ($28,78 \pm 0,56$ °T), ultima fiind cea a iaurtului cu microcapsule sinbiotice cu oligofructoză ($30,26 \pm 0,59$ °T).

Proprietățile senzoriale ale iaurtului precum: textura, mirosul caracteristic și gustul reprezintă indici de acceptabilitate pentru consumatori.

Tab. 4.2. Parametrii fizico-chimici și de textură ai probelor de iaurt din lapte de ovăz. Valorile medii și abaterea standard

Parametru	Perioada de depozitare(zile)						Valoare F		Tip de iaurt				Valoare F
	0	7	14	21	28				IM	IG	IINU	IOLI	I
L*	74,98± 0,02 ^{ab}	74,64± 0,01 ^{ab}	73,47± 0,03 ^a	76,09± 0,01 ^b	76,67± 0,02 ^b		4,08*		74,98± 0,02 ^a	74,37± 0,02 ^a	75,44± 0,01 ^a	75,39± 0,01 ^a	75,67 ±0,01 ^a
a*	-4,96± 0,01 ^a	-5,01± 0,02 ^a	-4,69± 0,03 ^b	-4,50± 0,01 ^c	-4,95± 0,02 ^a		59,78***		-4,76± 0,01 ^a	-4,88 ± 0,02 ^a	-4,83± 0,05 ^a	-4,85± 0,05 ^a	-4,79 ± 0,06 ^a
b*	14,39± 0,02 ^b	14,46± 0,02 ^b	15,57± 0,04 ^d	15,11± 0,02 ^c	14,03± 0,05 ^a		71,71***		14,63± 0,02 ^a	14,79± 0,04 ^a	14,77± 0,03 ^a	14,57± 0,01 ^a	14,82 ± 0,02 ^a
pH	3,75± 0,10 ^c	3,70± 0,08 ^{bc}	3,69± 0,12 ^{bc}	3,62± 0,12 ^{ab}	3,55± 0,10 ^a		8,335		3,82± 0,01 ^c	3,67± 0,01 ^b	3,53± 0,01 ^a	3,60± 0,01 ^{ab}	3,68± 0,01 ^b
Aciditate titrabilă (°T)	18,49± 1,88 ^a	28,06± 4,66 ^b	34,37± 0,82 ^{bc}	43,93± 10,60 ^d	36,75± 8,23 ^c		31,76***		24,27± 0,88 ^a	37,78± 0,56 ^b	33,00± 0,53 ^{ab}	36,26± 0,59 ^b	33,29 ± 2,02 ^{ab}
Adezivitate (J)	592,91± 43,3 ^c	846,29± 194,73 ^a	588,99± 113,23 ^c	792,20± 107,13 ^{ab}	683,52± 75,98 ^{bc}		14,65***		691,94± 4,89 ^a	720,14± 26,93 ^a	646,54 ± 11,87 ^a	700,58±1 0,21 ^a	744,7 3±19, 55 ^a
Duritate (g)	129,80± 10,91 ^a	193,50± 50,34 ^b	215,20± 49,36 ^b	302,93± 49,59 ^c	140,00± 25,39 ^a		58,32***		208,13± 4,01 ^a	192,10± 1,21 ^a	181,00 ± 2,01 ^a	201,86±1 81 ^a	198,3 3±1,0 1 ^a
Coezivitate	1,27± 0,17 ^{bc}	1,28± 0,39 ^{bc}	0,91± 0,33 ^a	1,07± 0,45 ^{ab}	1,48± 0,13 ^c		6,93***		1,09± 0,18 ^a	1,32± 0,06 ^a	1,22± 0,08 ^a	1,17± 0,08 ^a	1,22± 0,04 ^a
Aromă de ovăz	2,76± 0,20 ^a	2,94± 0,02 ^a	2,89± 0,15 ^a	2,86± 0,09 ^a	2,87± 0,13 ^a		1,12ns		2,84± 0,09 ^{ab}	2,92± 0,07 ^{ab}	2,78± 0,12 ^a	2,76± 0,17 ^a	3,02± 0,05 ^b
Acceptabilitate generală	17,23± 0,56 ^a	18,46± 0,38 ^c	17,60± 0,53 ^{ab}	18,11± 0,56 ^{bc}	18,14± 0,59 ^c		12,80***		18,46± 0,57 ^c	17,86± 0,72 ^{ab}	17,41± 0,71 ^a	17,54± 0,36 ^a	18,26 ± 0,23 ^{bc}

ns - nesemnificativ ($p > 0,05$), * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ ^{a-d} - litere diferite din același rând indică diferențe semnificative între probe ($p < 0,001$)

I M – iaurt fără microcapsule sinbiotice (probă martor); I STH – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu amidon; I INU – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu inulină; I G – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu glucoză; I OLI – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu oligofructoză.

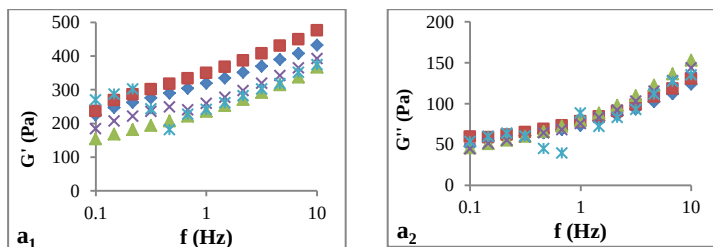
În studiul de față, pentru obținerea unui iaurt din lapte de ovăz cu o textură similară celui din lapte de origine animală, a fost necesară o cantitate de 16% substanță uscată (greutate/volum).

Cremozitatea, vâscozitatea și consistența au fost îmbunătățite odată cu creșterea concentrației de grăsime vegetală (ulei de cocos 1,5%). Astfel, după oprirea procesului de fermentație datele experimentale au arătat că prezența microcapsulelor din cele 4 tipuri de iaurt produs a avut o influență minoră prin comparație cu proba martor I M. Astfel, pentru probele de iaurt I M valoarea pentru duritate a fost de $208,13 \pm 4,01$ g, iar în celelalte probe aceasta valoare a scăzut (Tab. 4.3), cea mai mică valoare înregistrată a fost pentru iaurtul I INU.

Rezultatele experimentale obținute pentru coezivitate au arătat că valorile acestei caracteristici au scăzut de la momentul T_0 la momentul T_{21} pentru toate probele de iaurt. Prin compararea datelor obținute pentru adevizivitate, de la momentul T_0 la T_{21} , se observă o creștere a valorilor față de momentul T_0 .

Parametrii reologici au un rol cheie în definirea percepției texturale și senzoriale a unui produs. Proprietățile reologice (măsurarea vâscozității și a modulelor: G' – modulul de elasticitate, G'' - modulul de vâscozitate și η^* - vâscozitate complexă) oferă cele mai importante informații legate de reologia iaurtului. S-a observat că în raport, cu proba martor valorile vâscozității probelor de iaurt, pe parcursul perioadei de depozitare, au fost influențate de prezența microcapsulelor și de compoziția lor. Conform valorilor obținute pentru vâscozitate la momentul T_{28} , s-a observat că acestea nu se modifică considerabil față de cele obținute la momentul T_0 . Variația vâscozității probelor de iaurt s-a datorat hidrolizei proteice realizată de cultura starter, dar și prezenței fibrelor de β -glucani din ovăz.

Evoluția parametrilor vâscoelastici pe perioada de depozitare este redată în Fig. 4.1. Proprietățile vâscoelastice ale probelor și dependența acestora de frecvență au indicat un comportament neliniar al tuturor probelor de iaurt.



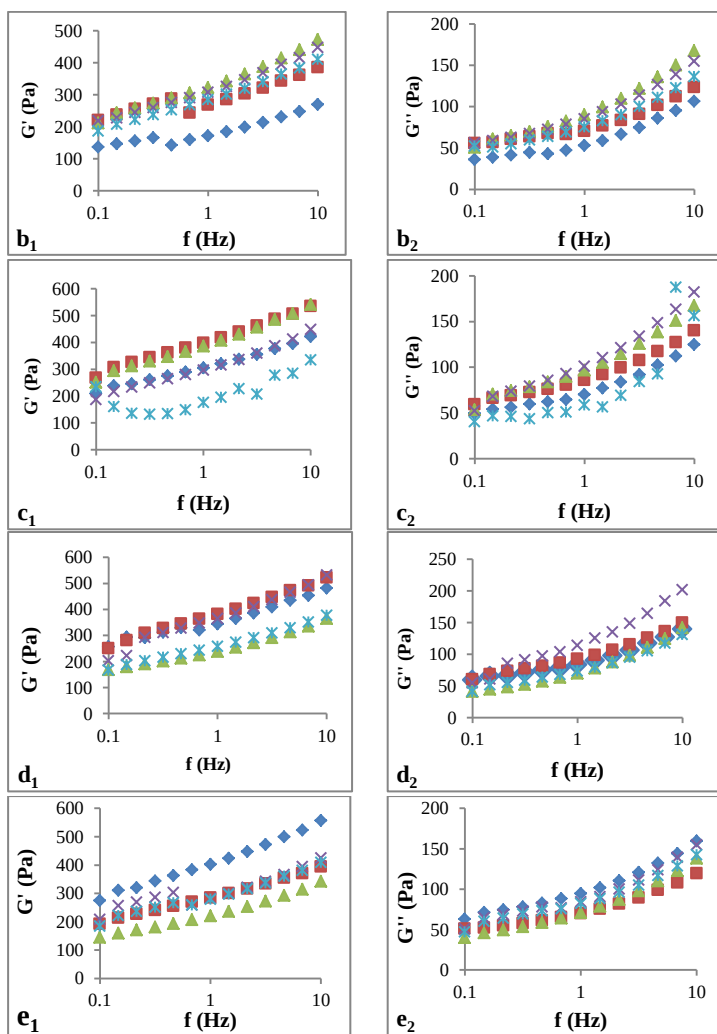


Fig. 4.1. Evoluția parametrilor vâscoelastici pe perioada de depozitare a iaurtului vegetal (1) G' – modulul de elasticitate, (2) G'' – modulul de vâscozitate; a – iaurt maror, fără microcapsule sinbiotice, b – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu glucoză, c – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu amidon, d – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu oligofructoză, e – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu inulină ♦ T_0 = momentul de analiză din ziua obținerii iaurtului; ■ T_7 , ▲ T_{14} , × T_{21} și × T_{28} – momentele de analiză a iaurtului raportat la ziua T_0 .

Comportamentul neliniar apare ca rezultat al modificărilor din structura iaurtului, în care particulele macroscopice au interacționat descrescător cu mediul de dispersie datorită perturbațiilor survenite la

creșterea vitezei de forfecare (Bahrim et al., 2005). Rezultatele au indicat un comportament predominant elastic având în vedere relația dintre modulul de elasticitate și modulul de vâscozitate: $G' > G''$ pentru toate probele de iaurt pe parcursul perioadei de depozitare. În consecință, toate probele pot fi descrise ca geluri fluide moi.

În prezentul studiu s-a urmărit obținerea unor iaurturi din lapte de ovăz care să ofere atât beneficii nutriționale, datorate combinației sinbiotice a compuşilor probiotici și prebiotici, cât și proprietăți senzoriale de calitate.

Prezența aromei de ovăz a fost evaluată folosind o scară de intensitate de la 0 = deloc la 5 = intens. Rezultatele analizei senzoriale (Fig. 4.2) au arătat că aroma de ovăz a fost percepută ca fiind slabă în majoritatea probelor de iaurt cu excepția iaurtului cu microcapsule sinbiotice cu amidon. Probele de iaurt cu microcapsule sinbiotice cu OLI au prezentat cele mai scăzute valori în ceea ce privește aroma de ovăz, iar cea mai intensă aromă de ovăz a fost percepută de către degustători în probele de iaurt cu microcapsule STH.

Pentru stabilirea calităților organoleptice pentru fiecare tip de iaurt în parte, s-a efectuat analiza punctajului mediu ponderat (P_{mp}). Datele obținute sunt prezentate în Fig. 4.2. Rezultatele evaluării senzoriale de la momentul T_0 arată că probele de iaurt sunt acceptabile. Cele mai apreciate iaurturi la momentul T_0 au fost I M ($P_{mp} = 17,87$) și I STH ($P_{mp} = 17,85$), urmate de I OLI, I G și I INU. Dintre toate tipurile de iaurt cu microcapsule sinbiotice, analizate pe parcursul celor 28 de zile de depozitare, iaurtul cu microcapsule cu amidon a fost cel care a obținut calificativul „foarte bun” la fiecare evaluare, celelalte probe au prezentat oscilații între calificativele „bun” și „foarte bun”.

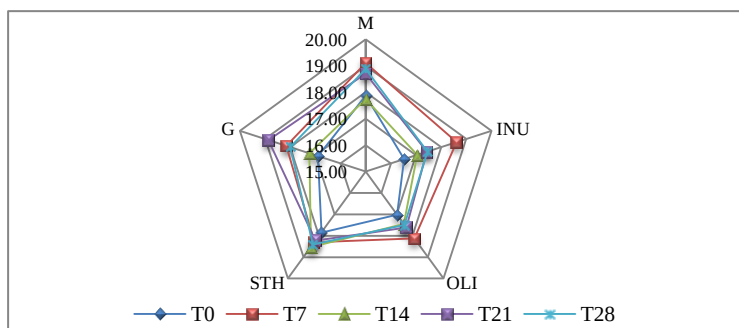


Fig. 4.2. Analiza senzorială a probelor de iaurt. P_{mp} – acceptabilitate generală; I M – iaurt maritor, fără microcapsule sinbiotice; I INU – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu inulină; I OLI – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu oligofructoză; I STH – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu amidon; I G – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu glucoză; $\bullet$ T_0 = momentul de analiză din ziua obținerii iaurtului, $\blacksquare$ – T_7 , $\blacktriangle$ – T_{14} , $\blacklozenge$ – T_{21} și $\star$ – T_{28} – momentele de analiză a iaurtului raportate la ziua T_0

Grupul de degustători au clasificat produsele în două tipuri, bune și foarte bune, oferind calificativul: „bun” (pentru I G, I OLI și I INU) și

„foarte bun” (pentru I M și I STH). Rezultatele obținute în urma analizei senzoriale au indicat faptul că iaurtul obținut din lapte de ovăz integral poate fi utilizat ca matrice alimentară pentru microcapsule sinbiotice, dar și ca aliment funcțional fără adaos de microcapsule.

Determinarea conținutului de acizi organici din alimente reprezintă un parametru important datorită interferenței sale cu calitatea, stabilitatea și profilul nutrițional al produsului finit (Gao et al., 2012). Determinarea conținutului de acizi organici s-a efectuat din probele de iaurt din fiecare etapă de analiză (Tab. 4.3). Acidul lactic este produsul de bază rezultat în urma fermentației glucidelor. Ca urmare a acestor procese fermentative, în iaurtul obținut din laptele de ovăz s-au identificat acizii organici: lactic, gluconic, citric și succinic. După 7 zile de depozitare s-a observat o creștere a conținutului de acizi organici ($8560,73 \pm 994,63$ mg/kg) ca urmare a metabolismului celular, atât de la nivelul microcapsulelor, cât și al matricei alimentare. Această creștere a avut loc până în T_{21} ($10.340,27 \pm 869,90$ mg/kg) la toate tipurile de iaurt, urmată de o scădere la momentul T_{28} ($9141,75 \pm 561,92$ mg/kg) ca o posibilă diminuare a resurselor metabolice. Creșterea conținutului de acizi organici a fost influențată de prezența microcapsulelor care au oferit resurse suplimentare biosintezei de acizi organici. Datele experimentale au arătat că acidul organic predominant este acidul lactic (valoarea maximă înregistrată a fost pentru I INU – $5426,17 \pm 902,42$ mg/kg), urmat de acidul gluconic, acidul acetic și cel succinic. Totodată s-a constatat lipsa acizilor formic, propionic și butiric. Absența acestora este benefică și indică obținerea unui produs alimentar lipsit de fermentații nedorite.

Comparativ cu alte cereale, ovăzul are un conținut mai ridicat de proteine, dar și de aminoacizi esențiali ceea ce îi oferă o valoare nutritivă ridicată. Conținutul de aminoacizi prezent în ovăz este foarte apropiat de o compoziție optimă pentru organismul uman (Brückner-Gühmann et al., 2019). S-a constatat că acest profil de aminoacizi prezenți în boabele de ovăz a ajutat la menținerea unei viabilități celulare ridicate pentru cultura starter pe întreaga perioadă de depozitare a iaurturilor, după finalizarea procesului de fermentație al laptelui vegetal.

În urma cercetărilor efectuate, datele obținute au arătat că cele 5 tipuri de iaurt din lapte de ovăz au în compoziția lor aminoacizi esențiali: glicină (Gly), valină (Val), leucină (Leu) și glutamină (Glu), dar și aminoacizi neesențiali: alanină (Ala), serină (Ser), prolină (Pro), asparagină (Asp), tioprolină (Thi), acid aspartic (AAsp), acid glutamic (AGlu) și acid α -aminopimelic (AAminop). Rezultatele profilului de aminoacizi după cele 28 de zile de depozitare ale iaurturilor (Tab. 4.4) au indicat o scădere față de momentul T_0 . S-a observat că pentru iaurtul martor (I M) cantitatea toală de aminoacizi în ziua producției (T_0) a fost de 38668 nmol/g, iar după cele 28 de zile (T_{28}) cantitatea toală de aminoacizi a fost redusă cu 31% (12044 nmol/g).

Tab. 4.3. Profilul de acizi organici din probele de iaurt din lapte de ovăz. Valorile medii și abaterea standard

Acizi organici (mg/kg)	Perioada de depozitare (zile)					Valoare F		Tip de iaurt				Valoare F	
	0	7	14	21	28			I M	I G	I INU	I OLI	I STH	
Acid gluconic	2703,91 ± 124,05 ^a	3391,21 ± 445,93 ^b	3898,38 ± 95,19 ^{bc}	4209,11 ± 93,91 ^c	3274,01 ± 613,69 ^{ab}	13,94***		3742,44 ± 554,77 ^a	3435,54 ± 581,37 ^a	3428,88 ± 706,85 ^a	3439,99 ± 734,81 ^a	3429,77 ± 724,93 ^a	0,21ns
Acid lactic	3580,53 ± 355,26 ^a	4204,24 ± 592,56 ^{ab}	5099,50 ± 816,39 ^b	4837,19 ± 870,60 ^{ab}	4870,50 ± 954,27 ^{ab}	3,42ns		3519,36 ± 240,72 ^a	4617,60 ± 754,32 ^{ab}	5426,17 ± 902,42 ^b	4769,49 ± 614,44 ^{ab}	4259,34 ± 684,02 ^{ab}	5,36*
Acid acetic	592,72 ± 18,13 ^a	704,64 ± 77,16 ^{ab}	874,93 ± 98,62 ^c	848,12 ± 111,09 ^{bc}	737,12 ± 105,92 ^{abc}	8,24***		628,83 ± 57,10 ^a	791,71 ± 142,52 ^a	803,78 ± 139,70 ^a	781,26 ± 123,67 ^a	751,95 ± 145,12 ^a	1,59ns
Acid succinic	224,58 ± 11,44 ^a	260,63 ± 18,41 ^a	313,09 ± 37,04 ^a	429,79 ± 94,26 ^b	260,10 ± 25,78 ^a	14,16***		270,39 ± 75,67 ^a	314,91 ± 118,13 ^a	273,35 ± 31,02 ^a	316,15 ± 97,26 ^a	313,39 ± 103,86 ^a	0,33ns
Conținutul total de acizi organici	7301,75 ± 460,58 ^a	8560,73 ± 994,63 ^{ab}	10201,4 ± 909,38 ^c	10340,2 ± 7 ± 869,90 ^c	9141,75 ± 561,92 ^{bc}	12,65***		8368,19 ± 547,26 ^a	9166,09 ± 1396,27 ^a	9938,64 ± 1618,96 ^a	9312,63 ± 1341,89 ^a	8760,33 ± 1588,16 ^a	0,95ns

ns - nesemnificativ ($p > 0,05$), * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

^{a-d} - litere diferite din același rând indică diferențe semnificative între probe ($p < 0,001$)

I M – iaurt fără microcapsule sinbiotice (probă martor); I STH – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu amidon; I INU – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu inulină; I G – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu glucoză; I OLI – iaurt ce conține microcapsule sinbiotice cu oligofructoză.

Tab. 4.4. Profilul de aminoacizi din probele de iaurt din lapte de ovăz. Valorile medii și abaterea standard

Aminoacizi liberi (mmol/g)	Perioada de depozitare (zile)						Valoare F		Tip de iaurt					Valoare F
	0	7	14	21	28				IM	IG	INU	I OLI	ISTH	
Alanină	432,7 ± 13,15 ^a	437,77 ± 8,60 ^a	430,17 ± 9,40 ^a	425,01 ± 10,19 ^a	416,47 ± 17,86 ^a		2,17ns		424,99 ± 16,70 ^a	432,56 ± 10,30 ^a	431,88 ± 10,30 ^a	423,21 ± 18,99 ^a	429,52 ± 13,70 ^a	0,43ns
Glicină	113,67 ± 34,47 ^a	81,47 ± 39,89 ^a	62,85 ± 38,99 ^a	80,78 ± 78,57 ^a	110,32 ± 110,93 ^a		1,03ns		115,68 ± 93,85 ^a	99,63 ± 10,23 ^a	72,38 ± 42,94 ^a	62,42 ± 69,39 ^a	49,08 ± 44,01 ^a	0,65ns
Valină	962,76 ± 602,96 ^a	874,32 ± 536,72 ^a	1209,00 ± 171,8 ^a	827,59 ± 206,35 ^a	1384,66 ± 687,6 ^a		1,17ns		956,02 ± 2,71 ^a	1070,54 ± 2,71 ^a	1155,57 ± 550,89 ^a	950,20 ± 375,96 ^a	1126,01 ± 456,91 ^a	0,15ns
Leucină	270,19 ± 23,46 ^b	276,03 ± 24,36 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a		493,26** *		111,23 ± 2,71 ^a	109,03 ± 89,18 ^a	104,65 ± 12,10 ^a	115,59 ± 18,88 ^a	105,71 ± 44,81 ^a	0,04ns
Serină	723,15 ± 14,58 ^{ab}	695,35 ± 10,75 ^a	724,28 ± 26,39 ^{ab}	739,14 ± 19,11 ^a	719,32 ± 29,40 ^{ab}		2,78ns		735,13 ± 13,99 ^a	518,10 ± 30,63 ^a	715,59 ± 12,10 ^a	721,15 ± 22,30 ^a	711,27 ± 34,78 ^a	0,66ns
Prolină	597,75 ± 6,05 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a		24,52***		237,81 ± 2,45 ^a	119,92 ± 1,87 ^a	120,38 ± 4,56 ^a	117,85 ± 3,21 ^a	118,79 ± 2,01 ^a	0,18ns
Asparagină	549,45 ± 17,16 ^b	499,36 ± 25,07 ^a	535,36 ± 23,01 ^{ab}	570,68 ± 13,75 ^b	506,84 ± 25,42 ^a		9,59**		548,48 ± 34,57 ^a	545,22 ± 30,57 ^a	513,55 ± 27,99 ^a	523,71 ± 42,42 ^a	530,72 ± 30,32 ^a	0,95ns
Tioprolină	493,43 ± 26,22 ^{ac}	507,88 ± 14,24 ^a	462,29 ± 11,67 ^{ab}	459,75 ± 13,85 ^a	475,83 ± 19,02 ^{ac}		6,71***		484,50 ± 35,57 ^a	468,33 ± 29,86 ^a	480,06 ± 19,69 ^a	491,03 ± 25,38 ^a	475,25 ± 11,79 ^a	0,56ns
Acid aspartic	5448,03 ± 531,26 ^{bc}	7395,41 ± 2464,98 ^c	3658,06 ± 1285,74 ^{ab}	2462,52 ± 610,42 ^a	1693,65 ± 918,47 ^a		13,59***		3628,58 ± 2033,41 ^a	5203,53 ± 3728,94 ^a	3649,60 ± 1981,05 ^a	4294,21 ± 2643,65	3881,75 ± 1869,23 ^a	0,31ns
Acid glutamic	6782,86 ± 644,69 ^b	9875,14 ± 3533,45 ^b	2872,66 ± 1326,94 ^a	1292,63 ± 727,68 ^a	746,28 ± 329,11 ^a		24,78***		3898,19 ± 3535,74 ^a	5436,04 ± 6363,42 ^a	3732,69 ± 3042,98 ^a	4671,42 ± 3635,05 ^a	3831,23 ± 3662,24 ^a	0,15ns
Acid α-aminopimeli c	14868,40 ± 2761,67 ^b	16965,29 ± 2134,40 ^b	6420,01 ± 1804,56 ^a	3475,26 ± 1804,56 ^a	2913,17 ± 1935,21 ^a		44,11***		10363,34 ± 6848,37 ^a	7599,52 ± 8120,64 ^a	9300,89 ± 6100,42 ^a	8307,49 ± 6729,09 ^a	8970,89 ± 6247,37 ^a	0,10ns
Glutamină	2198,04 ± 1627,49 ^a	1918,81 ± 281,51 ^a	3347,09 ± 1361,86 ^a	4468,75 ± 641,03 ^a	3752,33 ± 2335,47 ^a		2,72ns		2935,57 ± 916,76 ^a	3496,78 ± 2245,53 ^a	3241,76 ± 1497,11 ^a	2657,92 ± 1216,47 ^a	3353,06 ± 2444,37 ^a	0,18ns

ns - nesemnificativ ($p > 0,05$), * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ a^d - litere diferite din același rând indică diferențe semnificative între probe ($p < 0,001$)

IM – iaurt fără microcapsule simbiotice (probă martor); ISTH – iaurt ce conține microcapsule simbiotice cu amidon; INU – iaurt ce conține microcapsule simbiotice cu inulină; IG – iaurt ce conține microcapsule simbiotice cu glucoză; I OLI – iaurt ce conține microcapsule simbiotice cu oligofructoză.

Pentru iaurtul cu microcapsule sinbiotice cu glucoză s-a înregistrat la momentul T_0 o cantitate totală a aminoacizilor de 29055 nmol/g, iar la momentul T_{28} o cantitate de 15757 nmol/g. Aceeași tendință de scădere a cantității totale de aminoacizi s-a înregistrat și pentru iaurturile I INU (T_0 – 35209 nmol/g; T_{28} – 13947 nmol/g), I OLI (T_0 – 30381 nmol/g; T_{28} – 11991 nmol/g) și I STH (T_0 – 33889 nmol/g; T_{28} – 14761 nmol/g).

Analiza componentelor principale

Rezultatele determinărilor obținute pentru un grup de probe pot fi comparate utilizând analiza componentelor principale (PCA). În prezentul studiu, această metodă statistică a fost utilizată pentru a analiza și identifica probele de iaurt din lapte de ovăz care prezintă caracteristici similare.

Prima componentă principală (PC-1) a explicat 89% din variație, în timp ce a doua componentă principală (PC-2) a explicat 5% din variație; împreună, primele două componente principale au explicat 94% din variabilitatea inițială.

Separarea probelor de iaurt din lapte de ovăz s-a realizat în funcție de adaosul de microcapsule sinbiotice și de timpii de analiză, unde tipurile de iaurt sunt marcate ca: T_0 - T_{28} M – probă martor de iaurt, analizată din momentul obținerii acestuia până în ziua 28 (T_{28}); T_0 - T_{28} INU – probă de iaurt cu microcapsule sinbiotice cu inulină, analizată din momentul obținerii acestuia până în ziua 28 (T_{28}); T_0 OLI – probă de iaurt cu microcapsule sinbiotice cu oligofructoză, analizată din momentul obținerii acestuia până în ziua 28 (T_{28}); T_0 STH – probă de iaurt cu microcapsule sinbiotice cu amidon, analizată din momentul obținerii acestuia până în ziua 28 (T_{28}); T_0 G – probă de iaurt cu microcapsule sinbiotice cu glucoză, analizată din momentul obținerii acestuia până în ziua 28 (T_{28}); T_0 – momentul din ziua obținerii iaurtului; T_7 , T_{14} , T_{21} și T_{28} – momentele de analiză a iaurtului raportate la ziua T_0 .

După cum rezultă din Fig. 4.3, probele analizate la momentul T_0 sunt grupate într-un singur cadran. Printre probele analizate la momentul T_0 sunt intercalate și trei probe analizate în ziua a 7-a (I M, I STH și I INU), ceea ce demonstrează că proba martor de iaurt, proba de iaurt cu microcapsule sinbiotice cu amidon și proba de iaurt cu microcapsule sinbiotice cu inulină au prezentat după 7 zile de depozitare valori ale parametrilor analizați apropiate de cele rezultate la momentul T_0 .

Toate probele de iaurt cu adaos de microcapsule sinbiotice (I STH, I INU, I OLI și I G), analizate după 21 de zile au putut fi grupate prezentând valori similare ale parametrilor analizați. În același cadran sunt prezente și două dintre probele analizate în momentul T_{28} (I G și I STH). Celelalte 3 probe analizate după 28 de zile (I OLI, I INU și I M) au fost separate în alt cadran.

Probele analizate după 14 zile de la momentul obținerii iaurturilor nu au putut fi clar separate.



Fig. 4.3. Analiza componentelor principale - scoruri: T_0 - T_{28} M – probă martor de iaurt, analizată din momentul obținerii acestuia până în ziua 28 (T_{28}); T_0 - T_{28} INU – probă de iaurt cu microcapsule sinbiotice cu inulină, analizată din momentul obținerii acestuia până în ziua 28 (T_{28}); T_0 OLI – probă de iaurt cu microcapsule sinbiotice cu oligofructoză, analizată din momentul obținerii acestuia până în ziua 28 (T_{28}); T_0 STH – probă de iaurt cu microcapsule sinbiotice cu amidon, analizată din momentul obținerii acestuia până în ziua 28 (T_{28}); T_0 G – probă de iaurt cu microcapsule sinbiotice cu glucoză, analizată din momentul obținerii acestuia până în ziua 28 (T_{28}).

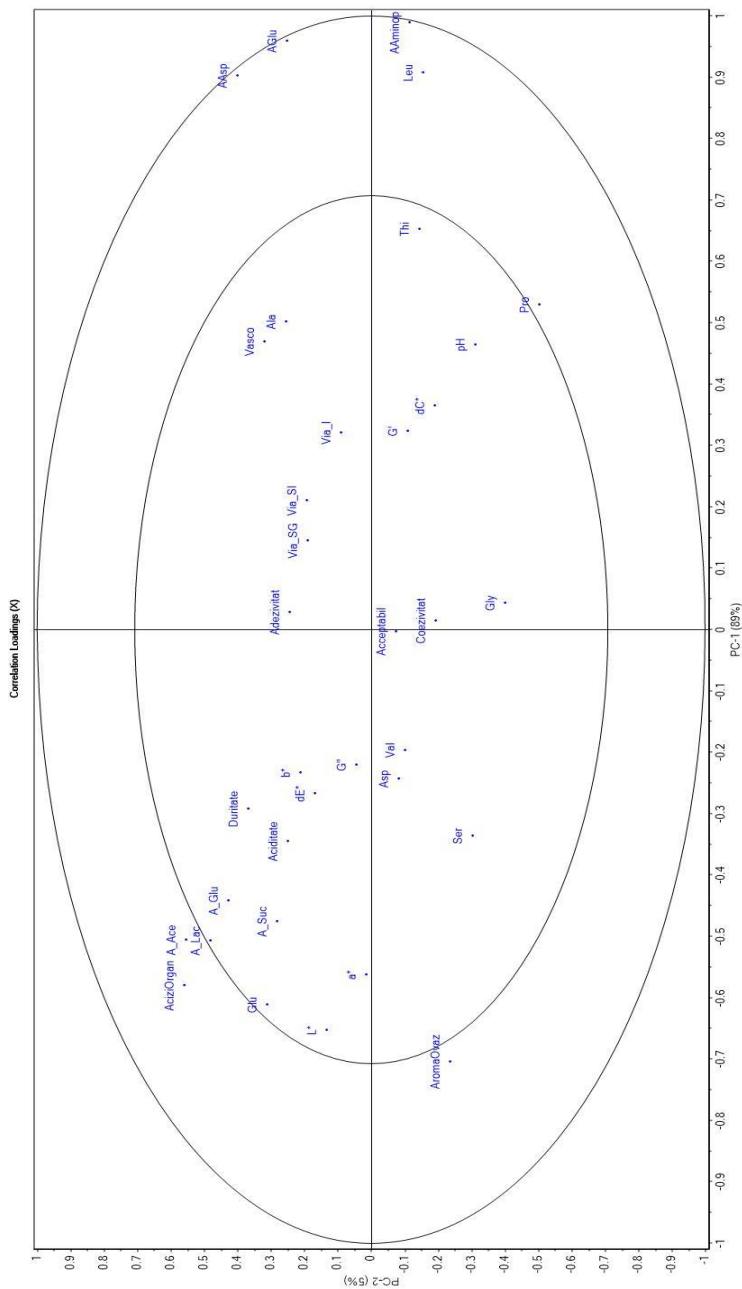


Fig. 4.4. Analiza componentelor principale – influența parametrilor: pH, L*, a*, b*, dE* – diferență totală de culoare, dC* – diferență opac/strălucire, Aciditate – aciditate titrabilă, AcizOrgan – acizi organici, A_Glu – acid gluconic, A_Lac – acid lactic, A_Ace – acid acetic, A_Suc – acid succinic, Aromă ovăz, Acceptabil – acceptabilitate, Adezivit – adezivitate, Cozivit – coezivitate, Duritate, Via_SG – viabilitate celulară în suc gastric, Via_SI – viabilitate celulară în suc intestinal, Via_I – viabilitate celulară în iaurt, Vasco – vâscoelasticitate, G' – modul elastic, G'' – modul vâscos, Amino – acid α -aminopimelic, Ser – serină, Pro – prolină, Asp – asparagină, Thi – tioprolină, AAsp – acid aspartic, A_Glu – acid glutamic, Ala – alanină, Gly – glicină, Val – valină, Leu – leucină, Glu – glutamină

Capitolul V cuprinde *Concluziile generale* ca urmare a rezultatelor experimentale obținute în cadrul acestei teze de doctorat, contribuții proprii și tendințe viitoare de dezvoltare a cercetării

Teza de doctorat intitulată: „*CERCETĂRI PRIVIND OBȚINEREA DE SINBIOTICE CU BACTERII DIN GENUL LACTOBACILLUS MICROÎNCAPSULATE PENTRU APLICAȚII ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ*” a vizat studiul dezvoltării de noi rețete optime pentru matricea de încapsulare a trei tulpini probiotice, cu aplicabilitate industrială, îmbunătățirea unui proces de încapsulare precum și obținerea unui aliment funcțional cu microcapsule sinbiotice. Pe baza rezultatelor experimentale obținute dar și a concluziilor parțiale prezentate la finalul fiecărui capitol, sunt prezentate sumativ concluziile generale ale studiului:

- ✓ Prebioticele selectate: Fibruline®DS2 (inulină din cicoare), amidon din cartofi și oligofructoză și utilizate ca substrat nutritiv pentru tulpinile probiotice: *L. casei*, *L. plantarum* și *L. rhamnosus* au favorizat creșterea de biomasă celulară, atât în culturile individuale cât și în cultura mixtă, în timpul incubăției la 37 °C. Creșterea biomasei celulare s-a realizat ca urmare a capacității tulpinilor probiotice de a descompune prebioticele, ceea ce a condus la utilizarea lor ca parte componentă a matricei de încapsulare;

- ✓ Cea mai bună formulă obținută pentru matricea de încapsulare conține: 2% prebiotic, 2% alginat, 10% ulei vegetal comestibil, 85% apă. Rezultatele au arătat că această matrice de încapsulare a oferit cea mai eficientă protecție tulpinilor probiotice în timpul procesului tehnologic de obținere a microcapsulelor, a depozitării în condiții de refrigerare timp de 30 de zile, dar și în urma acțiunii *in vitro* a sucurilor gastrointestinale;

- ✓ Cu ajutorul unui sistem inovativ de microîncapsulare prin extrudare s-au obținut microcapsule cu dimensiuni de 450 μm. Obținerea acestei dimensiuni reprezintă o noutate în domeniul microîncapsulării probioticelor;

- ✓ S-a demonstrat că menținerea viabilității celulelor probiotice microîncapsulate în matrici de alginat-prebiotic au prezentat valori mai mari de nivelul minim recomandat de FAO (10^6 - 10^7 ufc/g) în timpul procesului tehnologic de obținere al microcapsulelor și în urma acțiunii *in vitro* a sucurilor gastrointestinale simulate după cele 30 de zile de depozitare. Rezultatele experimentale au arătat că viabilitatea probioticelor microîncapsulate în matrici de alginat-prebiotic s-a menținut peste nivelul minim recomandat pe parcursul procesului de obținere, a depozitării dar și a acțiunii *in vitro* a sucurilor gastrointestinale simulate;

- ✓ Adaosul de microcapsule sinbiotice în iaurt nu a modificat, în timpul procesului tehnologic, parametrii fizico-chimici ai acestuia și activitatea metabolică din microcapsulele din produsul finit nu i-a produs modificări în perioada de depozitare. De asemenea, prezența microcapsulelor a păstrat caracteristicile reologice și de textură ale iaurtului, în raport cu proba martor fără microcapsule. După cele 21 de zile de depozitare a iaurturilor s-a observat o rată a viabilității celulare ridicată.

Prin urmare, compoziția matricei microcapsulelor sinbiotice, prebioticele alese și procesul de microîncapsulare au asigurat protecția celulelor de *L. casei*, *L. plantarum* și *L. rhamnosus* în timpul depozitării iaurtului timp de 21 de zile în condiții de refrigerare.

✓ După 21 de zile de depozitare în condiții de refrigerare a iaurtului, viabilitatea celulară din interiorul microcapsulelor adăugate în acesta, ca urmare a acțiunii *in vitro* a sucului gastric ($7,28 \pm 0,15 \log_{10} \text{ufc/g}$ - I STH, $7,84 \pm 0,05 \log_{10} \text{ufc/g}$ - I INU) și sucului intestinal ($8,13 \pm 0,05 \log_{10} \text{ufc/g}$ - I STH, $8,07 \pm 0,09 \log_{10} \text{ufc/g}$ - I INU) a fost peste limitele minime menționate de FAO/OMS (10^6 - 10^7 ufc/g) ceea ce recomandă utilizarea iaurtului ca matrice alimentară pentru microcapsulele sinbiotice.

✓ În vederea obținerii unui nou aliment funcțional a fost produsă o matrice alimentară din lapte de ovăz pentru 4 tipuri de microcapsule sinbiotice. Pentru a obține un iaurt din ovăz cu o textură similară celui din lapte de origine animală, a fost necesară o cantitate de 16% substanță uscată (greutate/volum).

✓ Datele experimentale arată că iaurtul din lapte de ovăz care conține microcapsule sinbiotice prezintă proprietăți similare cu cel fără microcapsule, ceea ce demonstrează că adaosul de sinbiotice nu modifică calitatea, textura și nici comportamentul reologic al produsului. Rezultatele experimentale au prezentat menținerea unei viabilități celulare optime în produsul alimentar pe toată perioada de depozitare a acestuia. De asemenea, după acțiunea sucurilor gastrointestinale simulate *in vitro* s-a verificat viabilitatea celulelor probiotice și s-a dovedit că atât matricele de încapsulare (INU, OLI, STH și G), cât și matricea alimentară au asigurat prezența în produs a unei încărcături celulare optime și după cele 28 de zile de depozitare. Cea mai ridicată încărcătură celulară a fost detectată în microcapsulele sinbiotice din iaurtul de ovăz I INU.

✓ Pe baza analizei senzoriale efectuată pe parcursul celor 28 de zile de depozitare, iaurturile din lapte de ovăz cu și fără adaos de microcapsule au fost evaluate cu calificativele „bun” și „foarte bun”. Iaurtul cel mai apreciat de degustători a fost cel fără microcapsule, urmat de iaurtul cu adaos de microcapsule cu amidon, glucoză, oligofructoză și inulină.

✓ În ceea ce privește viabilitatea celulară, atât iaurtul din lapte de ovăz fără adaos, cât și iaurtul din lapte de ovăz cu microcapsule sinbiotice, îndeplinesc criteriile de calitate recomandate de legislație.

✓ Iaurtul din lapte de ovăz cu adaos de microcapsule sinbiotice poate fi promovat ca produs alimentar funcțional, care pe lângă alte componente benefice (compuși bioactivi) are în compoziția sa 4 aminoacizi esențiali și 8 aminoacizi neesențiali. Absența acizilor butiric și propionic au arătat că pe perioada de depozitare, iaurturile nu au suferit procese de fermentație nedorite care ar fi putut afecta calitatea sa.

✓ Analiza componentelor principale a arătat că parametrii care contribuie mai mult la variabilitate sunt: conținutul de Leu (leucină), conținutul de AAminop (acid α -aminopimelic), AGlu (acid glutamic), AAsp

(acid aspartic), aroma de ovăz, A_Ace (acidul acetic) și A_Lac (acidul lactic).

În concluzie, tulpinile probiotice microîncapsulate pot fi adăugate în produsele lactate fermentate de tip iaurt din lapte de origine animală și în iaurt vegetal din lapte de ovăz. Acceptabilitatea acestor produse, demonstrată de rezultatele analizei senzoriale, creează toate premisele lansării pe piață a unor produse lactate și vegetale funcționale.

Contribuții proprii

Studiile efectuate în această teză de doctorat oferă o serie de date valoroase, fundamentale și aplicative care contribuie la diversificarea gamei de produse alimentare funcționale. Datele obținute oferă o mai bună cunoaștere a comportamentului biotehnologic, a stabilității și a menținerii viabilității celulare a trei tulpini probiotice (produse și distribuite de două companii de renume: Christian Hansen, Danemarca și Bioprox, Franța) supuse procesului de microîncapsulare împreună cu prebiotice și utilizate în produsele alimentare fermentate (iaurt tradițional și iaurt vegetal).

Contribuția originală se concretizează printr-o serie de elemente de noutate care sporesc valoarea științifică a studiilor efectuate și constă în:

1. Au fost luate în studiu 3 tulpini de lactobacili și asociate pentru prima dată sub formă de cultură mixtă încapsulată în produse alimentare.

2. A fost studiată creșterea biomasei celulare atât pentru fiecare tulpină probiotică în parte cât și pentru cultura mixtă, pe 3 substraturi prebiotice (Fibruline®DS2, amidon și oligofructoză) în comparație cu un mediu fără substrat nutritiv și un mediu cu glucoză.

3. A fost dezvoltat un sistem de microîncapsulare prin extrudare, cu ajutorul căruia s-a reușit stabilirea formulei optime pentru matricea microcapsulei care să ofere atât protecție tulpinilor probiotice, cât și menținerea unei viabilități celulare ridicate cu aplicabilitate în industria alimentară.

4. A fost obținut pentru prima dată un iaurt inoculat cu cele 3 tulpini probiotice microîncapsulate

5. A fost dezvoltat un produs vegetal pe bază de lapte din ovăz (din boabe integrale) cu sinbiotice a căror viabilitate celulară respectă cerințele internaționale.

Diseminarea rezultatelor cercetărilor

Diseminarea rezultatelor cercetărilor efectuate pe parcursul studiilor doctorale s-a materializat prin publicarea sau comunicarea unor lucrări științifice după cum urmează:

A. Articole publicate în reviste indexate/cotate ISI Web of Knowledge

1. **Luca, L.;** Oroian, M. Influence of Different Prebiotics on Viability of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and

Lactobacillus rhamnosus Encapsulated in Alginate Microcapsules. Foods 2021, 10, 710. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10040710>, (factor de impact - 4.092, revistă Q2), <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/4/710>

2. **Liliana LUCA**, Mircea OROIAN. The impact of potential prebiotics inulin, oligofructose and potato starch on the growth of *Lactobacillus casei* - AgroLife Scientific Journal - Volume 8, Number 1, 2019, Link: http://agrolifejournal.usamv.ro/pdf/vol.VIII_1/Art20.pdf AgroLife Scientific Journal, Vol. X, Issues 1 & 2 /2021, ISSN 2285-5718. (<http://agrolifejournal.usamv.ro>).

B. Articole publicate în reviste indexate în Baze de Date Internaționale (BDI)

1. **L. Luca**, Mircea-Adrian Oroian, A. Lobiuc. The prebiotic potential of some carbohydrate substrates on the growth of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* - Journal Food and Environment Safety of the Suceava University, Link: <http://fiold.usv.ro/fiajournal/index.php/FENS/article/view/638>

2. **Liliana LUCA**, Mircea OROIAN. The effect of microencapsulation and potato starch on the survival of lactobacillus strains - Journal Food and Environment Safety of the Suceava University Link: <http://fiold.usv.ro/fiajournal/index.php/FENS/article/view/719>

3. **Liliana LUCA**, Mircea OROIAN. Stability of *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* and *L. rhamnosus* in two types of microcapsules - Journal SCIENTIFIC BULLETIN BIOTECHNOLOGIES Volume XXIV, No. 1, 2020 link: <http://biotechnologyjournal.usamv.ro/Section6-Biotechnology:ScientificBulletin> "Biotechnology". Series F, Vol. XXV, 2021, ISSN 2285 -1364, ISSN CD-ROM 2285- 5521, ISSN Online 2285- 1372, ISSN-L 2285-1364, (<http://biotechnologyjournal.usamv.ro>).

C. Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale

1. **Luca L.**, Oroian, M., The impact of potential prebiotics inulin, oligofructose and potato starch on the growth of *Lactobacillus casei*, Conferința Internațională "Agriculture for Life, Life for Agriculture", București,, 6-8 Iunie 2019.

2. **Luca L.**, Oroian, M., Stability of *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* and *L. rhamnosus* in two types of microcapsules, Conferința Internațională "Agriculture for Life, Life for Agriculture", București,, 4-6 Iunie 2020.

3. **Luca L.**, Oroian, M., Evaluation of the effect of prebiotic concentration in maintaining better cellular viability of

probiotics, Conferința Internațională „Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution” (April 15-16, 2021, Kyiv, Ukraine).

Bibliografie selectivă

Aaltonen K, Laurikka P, Huhtala H et al (2017) The long-term consumption of oats in celiac disease patients is safe: a large cross-sectional study. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu9060611>

Acker, B. W., & Cash, B. D. (2017). Medicinal foods for functional GI disorders. *Current gastroenterology reports*, 19(12), 62.

Ai J, Li AL, Su BX, Meng XC: Multi-cereal beverage fermented by *Lactobacillus helveticus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Food Sci* 2015, 80:1259-1265.

Bosnea, L. A., Kopsahelis, N., Kokkali, V., Terpou, A., & Kanellaki, M. (2017). Production of a novel probiotic yogurt by incorporation of *L. casei* enriched fresh apple pieces, dried raisins and wheat grains. *Food and Bioprocess Technology*, 10(2), 62-71.

Perina, N. P., Granato, D., Hirota, C., Cruz, A. G., Bogsan, C. S. B., & Oliveira, M. N. (2015). Effect of vegetal-oil emulsion and passion fruit peel-powder on sensory acceptance of functional yogurt. *Food Research International*, 70, 134-141.

Fazilah, N. F., Ariff, A. B., Khayat, M. E., Rios-Solis, L., & Halim, M. (2018). Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. *Journal of Functional Foods*, 48, 387-399.

Šmid, A., Strniša, L., Bajc, K., Vujić-Podlipec, D., Matijašić, B. B., & Rogelj, I. (2016). Randomized clinical trial: The effect of fermented milk with the probiotic cultures *Lactobacillus acidophilus* La-5® and *Bifidobacterium* BB-12® and Beneo dietary fibres on health-related quality of life and the symptoms of irritable bowel syndrome in adults. *Journal of Functional Foods*, 24, 549-557

Liu, F., Li, P., Chen, M., Luo, Y., Prabhakar, M., Zheng, H., ... & Zhou, H. (2017). Fructooligosaccharide (FOS) and galactooligosaccharide (GOS) increase *Bifidobacterium* but reduce butyrate producing bacteria with adverse glycemic metabolism in healthy young population. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.

Kleniewska, P., Hoffmann, A., Pniewska, E., & Pawliczak, R. (2016). The influence of probiotic *Lactobacillus casei* in combination with prebiotic inulin on the antioxidant capacity of human plasma. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016

Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.

Rodiño-Janeiro, B. K., Vicario, M., Alonso-Cotoner, C., Pascua-García, R., & Santos, J. (2018). A review of microbiota and irritable bowel syndrome: future in therapies. *Advances in therapy*, 35(3), 289-310.

Bustamante, M., Oomah, B. D., Oliveira, W. P., Burgos-Díaz, C., Rubilar, M., & Shene, C. (2020). Probiotics and prebiotics potential for the care of skin, female urogenital tract, and respiratory tract. *Folia microbiologica*, 65(2), 245-264.

Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of food science and technology*, 52(12), 7577-7587.

Altemimi A.B. Extraction and Optimization of Potato Starch and Its Application as a Stabilizer in Yogurt Manufacturing. *Foods* **2018**, 7, 14.

Arslan, S. (2015). A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *CyTA-Journal of Food*, 13(3), 340-345.

Aryana, K.J. & Olson, D.W. (2017). A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9987-10013.

Ashwar, B. A., Gani, A., Gani, A., Shah, A., & Masoodi, F. A. (2018). Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. *Food chemistry*, 239, 287-294.

Barbosa, J., & Teixeira, P. (2017). Development of probiotic fruit juice powders by spray-drying: A review. *Food Reviews International*, 33(4), 335-358.

Bernat, N., Cháfer, M., González-Martínez, C., Rodríguez-García, J., & Chiralt, A. (2015). Optimisation of oat milk formulation to obtain fermented derivatives by using probiotic *Lactobacillus reuteri* microorganisms. *Food Science and Technology International*, 21(2), 145-157.

Brückner-Gühmann, M., Benthin, A., & Drusch, S. (2019). Enrichment of yoghurt with oat protein fractions: Structure formation, textural properties and sensory evaluation. *Food Hydrocolloids*, 86, 146-153.

Çabuk, B., & Harsa, Ş. T. (2015). Improved viability of *Lactobacillus acidophilus* NRRL-B 4495 during freeze-drying in whey protein-pullulan microcapsules. *Journal of microencapsulation*, 32(3), 300-307.

Caggia, C., De Angelis, M., Pitino, I., Pino, A., & Randazzo, C. L. (2015). Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses. *Food microbiology*, 50, 109-117.

Calabuig-Jimenez, L., Betoret, E., Betoret, N., Patrignani, F., Barrera, C., Seguí, L. ...& Dalla Rosa, M. (2019). High pressures homogenization (HPH) to microencapsulate *L. salivarius* spp. *salivarius* in mandarin juice. Probiotic survival and *in vitro* digestion. *Journal of Food Engineering*, 240, 43-48.

Cavalheiro, C. P., Ruiz-Capillas, C., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F., de Menezes, C. R., & Fries, L. L. M. (2015). Application of probiotic delivery systems in meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 120-131.

Călinoiu, L. F., Ștefănescu, B. E., Pop, I. D., Muntean, L., & Vodnar, D. C. (2019). Chitosan coating applications in probiotic microencapsulation. *Coatings*, 9(3), 194.

Champagne, C.P., da Cruz, A.G. & Daga, M. (2018). Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. *Current Opinion in Food Science*, 22, 160-166

Choi, E. A., & Chang, H. C. (2015). Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 210-217.

Choińska-Pulit, A., Mituła, P., Śliwka, P., Łaba, W., & Skaradzińska, A. (2015). Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 212-221.

Codină, G. G., Franciuc, S. G., & Mironeasa, S. (2016). Rheological characteristics and microstructure of milk yogurt as influenced by quinoa flour addition. *Journal of Food Quality*, 39(5), 559-566.

Comunian, T. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2016). Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. *Food Hydrocolloids*, 61, 442-457.

Costa, G.M., Paula, M.M., Barão, C.E., Klososki, S.J., Bonafé, E.G., Visentainer, J.V. ... & Pimentel, T.C. (2019). Yoghurt added with *Lactobacillus casei* and sweetened with natural sweeteners and/or prebiotics: Implications on quality parameters and probiotic survival. *International dairy journal*, 97, 139-1

da Costa, G.M., de Carvalho Silva, J.V., Mingotti, J.D., Barão, C.E., Klososki, S.J. & Pimentel, T.C. (2017). Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. *LWT*, 75, 195-201.

Darjani, P., Nezhad, M. H., Kadkhodae, R., & Milani, E. (2016). Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. *LWT*, 73, 162-167.

de Araújo Etchepare, M., Raddatz, G. C., de Moraes Flores, É. M., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Barin, J. S., ... & de Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 511-517.

de Farias, T. G. S., Ladislau, H. F. L., Stamford, T. C. M., Medeiros, J. A. C., Soares, B. L. M., Arnaud, T. M. S., & Stamford, T. L. M. (2019). Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream. *LWT*, 100, 391-396.

De Prisco, A., & Mauriello, G. (2016). Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 27-39.

- De Prisco, A., Maresca, D., Ongeng, D., & Mauriello, G. (2015). Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. *LWT-Food Science and Technology*, 61(2), 452-462.
- de Simone, C. (2019). The unregulated probiotic market. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17(5), 809-817.
- Delgado, P.; Bañón, S. Effects of replacing starch by inulin on the physicochemical, texture and sensory characteristics of gummy jellies. *CyTA-Journal of Food* 2018, 16, doi:10.1080/19476337.2017.1327462.
- Delgado, T., Ramalhosa, E., Pereira, J. A., & Casal, S. (2018). Organic acid profile of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) as affected by hot air convective drying: drying influence on chestnut organic acids. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 557-565.)
- Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., & Maji, T. K. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Advances in colloid and interface science*, 239, 136-145.
- Dias, D. R., Botrel, D. A., Fernandes, R. V. D. B., & Borges, S. V. (2017). Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Current Opinion in Food Science*, 13, 31-37.
- Dimitrellou, D., Kandyliis, P., Lević, S., Petrović, T., Ivanović, S., Nedović, V., & Kourkoutas, Y. (2019). Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 in alginate capsules for probiotic fermented milk production. *LWT*, 116, 108501.
- Dogahe, M. K., Khosravi-Darani, K., Tofighi, A., Dadgar, M., & Mortazavian, A. M. (2015). Effect of process variables on survival of bacteria in probiotics enriched pomegranate juice. *Biotechnology Journal International*, 37-50.
- Dupuis, J. H., & Liu, Q. (2019). Potato starch: A review of physicochemical, functional and nutritional properties. *American Journal of Potato Research*, 96(2), 127-138.
- Espitia, P. J., Batista, R. A., Azeredo, H. M., & Otoni, C. G. (2016). Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Research International*, 90, 42-52.
- Ester, B., Noelia, B., Laura, C. J., Francesca, P., Cristina, B., & Rosalba, L. (2019). Probiotic survival and *in vitro* digestion of *L. salivarius* spp. *salivarius* encapsulated by high homogenization pressures and incorporated into a fruit matrix. *LWT*, 111, 883-888.
- FAO, W. (2002). Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. *London Ontario, Canada: FAO/WHO Working Group Report*
- Fareez, I. M., Lim, S. M., Mishra, R. K., & Ramasamy, K. (2015). Chitosan coated alginate–xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. *International journal of biological macromolecules*, 72, 1419-1428. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.10.054

- Ghosh, K., Ray, M., Adak, A., Dey, P., Halder, S. K., Das, A., ... & Mondal, K. C. (2015). Microbial, saccharifying and antioxidant properties of an Indian rice based fermented beverage. *Food chemistry*, 168, 196-202.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 14(8), 491-502.
- Gullon, B., Pintado, M. E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2015). In vitro gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. *Journal of Functional Foods*, 19, 617-628
- Gupta, M., & Bajaj, B. K. (2017). Development of fermented oat flour beverage as a potential probiotic vehicle. *Food Bioscience*, 20, 104-109.
- Harris, L. A., & Baffy, N. (2017). Modulation of the gut microbiota: a focus on treatments for irritable bowel syndrome. *Postgraduate medicine*, 129(8), 872-888.
- Hassani, A., Zarnkow, M., & Becker, T. (2015). Optimisation of fermentation conditions for probiotication of sorghum wort by *Lactobacillus acidophilus* LA5. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(10), 2271-2279.
- He, J., Han, Y., Liu, M., Wang, Y., Yang, Y. & Yang, X. (2019). Effect of 2 types of resistant starches on the quality of yogurt. *Journal of dairy science*, 102(5), 3956-3964.
- Hossain, M. I., Sadekuzzaman, M., & Ha, S. D. (2017). Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. *Food Research International*, 100, 63-73.
- Huang, S., Vignolles, M. L., Chen, X. D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 63,1
- İçier, F., Gündüz, G. T., Yılmaz, B., & Memeli, Z. (2015). Changes on some quality characteristics of fermented soy milk beverage with added apple juice. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 57-64.
- Iravani, S., Korbekandi, H., & Mirmohammadi, S. V. (2015). Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4679-4696.
- Islam, M. K., Hasan, M. S., Al Mamun, M. A., Kudrat-E-Zahan, M., & Al-Bari, M. A. A. (2015). Lemon juice synergistically preserved with lactobacilli ameliorates inflammation in shigellosis mice. *Advances in Pharmacology and Pharmacy*, 3(1), 11-21.
- Iurciuc, C. E., Savin, A., Lungu, C., Martin, P., & Popa, M. (2016). Gellan. Food applications. *Cellulose Chemistry and Technology*., 13.

- Jantarathin, S., Borompichaichartkul, C., & Sanguandeekul, R. (2017). Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its effect on viability under heat process in shrimp feeding. *Materials Today: Proceedings*, 4(5), 6166-6172
- Jonkers, D. M. (2016). Microbial perturbations and modulation in conditions associated with malnutrition and malabsorption. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(2), 161-172.
- Kandyliis, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M., & Koutinas, A. A. (2016). Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 7, 58-63.
- Kanjan, P., & Hongpattarakere, T. (2017). Prebiotic efficacy and mechanism of inulin combined with inulin-degrading *Lactobacillus paracasei* I321 in competition with *Salmonella*. *Carbohydrate Polymers*, 169, 236-244.
- Karimi, R., Azizi, M. H., Ghasemlou, M., & Vaziri, M. (2015). Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. *Carbohydrate Polymers*, 119, 85-100.
- Kaur, S., Kaur, P., & Nagpal, R. (2015). In vitro biosurfactant production and biofilm inhibition by lactic acid bacteria isolated from fermented food products. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, 10(1), 17
- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*, 26(3), 927-939.
- Khalighi, A., Behdani, R., & Kouhestani, S. (2016). Probiotics: A comprehensive review of their classification, mode of action and role in human nutrition. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*, 10, 63646.
- Khorasani, A. C., & Shojaosadati, S. A. (2017). Starch-and carboxymethylcellulose-coated bacterial nanocellulose-pectin bionanocomposite as novel protective prebiotic matrices. *Food Hydrocolloids*, 63, 273-285.
- Kumar, B. V., Vijayendra, S. V. N., & Reddy, O. V. S. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6112-6124.
- Liu, Z., Wang, W., Huang, G., Zhang, W., & Ni, L. (2016). In vitro and in vivo evaluation of the prebiotic effect of raw and roasted almonds (*Prunus amygdalus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(5), 1836-1843.
- Lopes, L. A. A., Carvalho, R. D. S. F., Magalhães, N. S. S., Madruga, M. S., Athayde, A. J. A. A., Portela, I. A., ... & Stamford, T. C. M. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-05 and incorporation in vegan milks: Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 109295

Lopes, S. M. S., Krausová, G., Carneiro, J. W. P., Gonçalves, J. E., Gonçalves, R. A. C., & de Oliveira, A. J. B. (2017). A new natural source for obtainment of inulin and fructo-oligosaccharides from industrial waste of *Stevia rebaudiana* Bertonii. *Food Chemistry*, 225, 154-161.

Luca, L., & Oroian, M. (2021). Influence of Different Prebiotics on Viability of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* Encapsulated in Alginate Microcapsules. *Foods*, 10(4), 710.

Luca, L., Oroian, M., & LOBIUC, A. (2019). The prebiotic potential of some carbohydrate substrates on the growth of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Food & Environment Safety*, 18(2).

Liliana, Luca., & Oroian, M. (2020). The effect of microencapsulation and potato starch on the survival of *Lactobacillus* strains. *Food and Environment Safety Journal*, 19(2).

Luca, L., & Oroian, M. Stability of *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* and *L. rhamnosus* in two types of microcapsules. *Journal Scientific bulletin biotechnologies* Volume XXIV, No. 1, 2020

Luca, L., & Oroian, M. (2019). The impact of potential prebiotics inulin, oligofructose and potato starch on the growth of *Lactobacillus casei*. *AgroLife Scientific Journal*, 8(1), 153-159.

Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 15-25.

Martinez, R.C.R., Bedani, R. & Saad, S.M.I. (2015). Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: An update for current perspectives and future challenges. *British Journal of Nutrition*, 114(12), 1993.

Mende, S., Rohm, H. & Jaros, D. (2016). Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *International Dairy Journal*, 52, 57-7

Min, M., Bunt, C. R., Mason, S. L., & Hussain, M. A. (2019). Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 2626-2641.

Mizock, B. A. (2015). Probiotics. *Disease-a-Month*, 61(7), 259-290.

Mridula, D., & Sharma, M. (2015). Development of non-dairy probiotic drink utilizing sprouted cereals, legume and soymilk. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 482-487.

Nguyen, B. T., Bujna, E., Fekete, N., Tran, A., Rezessy-Szabo, J. M., Prasad, R., & Nguyen, Q. D. (2019). Probiotic beverage from pineapple juice fermented with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Frontiers in nutrition*, 6, 54.

Ni, D., Xu, W., Zhu, Y., Zhang, W., Zhang, T., Guang, C., & Mu, W. (2019). Inulin and its enzymatic production by inulosucrase: Characteristics, structural features, molecular modifications and applications. *Biotechnology advances*, 37(2), 306-318

- Onyenweaku et al., F., Obeagu, E. I., Ifediora, A. C., & Nwandikor, U. U. (2016). Health benefits of probiotics. *International Journal of Innovative and Applied Research*, 4, 21-30.
- Oroian, M., & Ropciuc, S. (2017). Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds. *Computers and Electronics in Agriculture*, 138, 148-156.
- Oroian, M., Ropciuc, S. și Paduret, S. (2018). Autentificarea mierii folosind proprietăți reologice și fizico-chimice. *Jurnalul de știință și tehnologie alimentară*, 55 (12), 4711-4718.
- Oroian, M., Ropciuc, S., Paduret, S., & Todosi, E. (2018). Rheological analysis of honeydew honey adulterated with glucose, fructose, inverted sugar, hydrolysed inulin syrup and malt wort. *LWT*, 95, 1-8.
- Ortiz, Y., García-Amézquita, E., Acosta, C.H. & Sepúlveda, D.R. (2017). Functional dairy products. In G. Barbosa-Cánovas (Ed.). *Global food security and wellness* (pp. 67-103). New York: Springer. and future challenges. *British Journal of Nutrition*, 114, 1993-2015.
- Osimani, A., Garofalo, C., Aquilanti, L., Milanović, V., & Clementi, F. (2015). Unpasteurised commercial boza as a source of microbial diversity. *International journal of food microbiology*, 194, 62-70.
- Panduru, M., Panduru, N. M., Sălăvăstru, C. M., & Tiplica, G. S. (2015). Probiotics and primary prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized controlled studies. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 29(2), 232-242.
- Panghal, A., Janghu, S., Virkar, K., Gat, Y., Kumar, V., & Chhikara, N. (2017). Potential non-dairy probiotic products—A healthy approach. *Food Bioscience*.
- Patrignani, F., Siroli, L., Serrazanetti, D. I., Braschi, G., Betoret, E., Reinheimer, J. A., & Lanciotti, R. (2017). Microencapsulation of functional strains by high pressure homogenization for a potential use in fermented milk. *Food Research International*, 97, 250-257.
- Peredo, A. G., Beristain, C. I., Pascual, L. A., Azuara, E., & Jimenez, M. (2016). The effect of prebiotics on the viability of encapsulated probiotic bacteria. *LWT*, 73, 191-196.
- Pereira, A. L. F., & Rodrigues, S. (2018). Turning fruit juice into probiotic beverages. In *Fruit juices* (pp. 279-287). Academic Press.
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2015). Challenges for the production of probiotic fruit juices. *Beverages*, 1(2), 95-103.
- Pimentel, T. C., Madrona, G. S., Garcia, S., & Prudencio, S. H. (2015). Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 415-422.
- Pinto, S. S., Verruck, S., Vieira, C. R., Prudêncio, E. S., Amante, E. R., & Amboni, R. D. (2015). Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of *Bifidobacterium*-BB-12 under

simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1004-1009.

Pinto-Sánchez, M. I., Causada-Calo, N., Bercik, P., Ford, A. C., Murray, J. A., Armstrong, D., ... & Green, P. (2017). Safety of adding oats to a gluten-free diet for patients with celiac disease: systematic review and meta-analysis of clinical and observational studies. *Gastroenterology*, 153(2), 395-409.

Pradeep Prasanna, P.H. & Charalampopoulos, D. (2019). Encapsulation in an alginate-goats' milk-inulin matrix improves survival of probiotic *Bifidobacterium* in simulated gastrointestinal conditions and goats' milk yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 72(1), 132-141.

Prado, F. C., Lindner, J. D. D., Inaba, J., Thomaz-Soccol, V., Brar, S. K., & Soccol, C. R. (2015). Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, 12, 489-497.

Prasanna, P.H.P. & Charalampopoulos, D. (2018). Encapsulation of *Bifidobacterium longum* in alginate-dairy matrices and survival in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, cow milk and goat milk. *Food Bioscience*, 21, 72-79.

Puerari, C., Magalhães-Guedes, K. T., & Schwan, R. F. (2015). Physicochemical and microbiological characterization of chicha, a rice-based fermented beverage produced by Umutina Brazilian Amerindians. *Food Microbiology*, 46, 210-217.

Raddatz, G. C., Poletto, G., de Deus, C., Codevilla, C. F., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., ...& de Menezes, C. R.(2019). Use of prebiotic sources to increase probiotic viability in pectin microparticles obtained by emulsification/internal gelation followed by freeze-drying. *Food Research International*, 108902

Rasane, P., Jha, A., Kumar, A., & Sharma, N. (2015). Reduction in phytic acid content and enhancement of antioxidant properties of nutriceals by processing for developing fermented baby food. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3219–3234.

Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., & Wani, S. M. (2017). Effect of double alginate microencapsulation on *in vitro* digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT-Food Science and Technology*, 83, 50-58.

Robles, A., Fabjanowicz, M., Chmiel, T., & Płotka-Wasyłka, J. (2019). Determination and identification of organic acids in wine samples. Problems and challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 120, 115630.

Rodiño-Janeiro, B. K., Vicario, M., Alonso-Cotoner, C., Pascua-García, R., & Santos, J. (2018). A review of microbiota and irritable bowel syndrome: future in therapies. *Advances in therapy*, 35(3), 289-310.

Rotar, A. M., Vodnar, D. C., Bunghez, F., Cătunescu, G. M., Jimborean, M., & Semeniuc, C. A. (2015). Effect of goji berries and honey

on lactic acid bacteria viability and shelf life stability of yoghurt. *Notulae botanicae horti agrobotanici cluj-napoca*, 43(1), 196-203.

Salmerón, I., Thomas, K., & Pandiella, S. S. (2015). Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. *Journal of Functional Foods*, 15, 106-115

Sánchez, M. T., Ruiz, M. A., Lasserrot, A., Hormigo, M., & Morales, M. E. (2017). An improved ionic gelation method to encapsulate *Lactobacillus* spp. bacteria: Protection, survival and stability study. *Food Hydrocolloids*, 69, 67-75.

Santos, M., E. Gerbino, E. Tymczyszyn, and A. Gómez-Zavaglia. 2015. Prebiotics as protectants of lactic acid bacteria. *Cryobiology* 71:550.

Sarao, L. K., & Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(2), 344-371.

Sengupta, S., Koley, H., Dutta, S., & Bhowal, J. (2019). Hepatoprotective effects of synbiotic soy yogurt on mice fed a high-cholesterol diet. *Nutrition*, 63, 36-44.

Serban, D. E. (2014). Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer letters*, 345(2), 258-270.

Shafizadeh, A., Golestan, L., Ahmadi, M., Darjani, P., & Ghorbani-HasanSaraei, A. (2020). Encapsulation of *Lactobacillus casei* in alginate microcapsules: improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions using flaxseed mucilage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-8

Shoaib, M., Shehzad, A., Omar, M., Rakha, A., Raza, H., Sharif, H. R., ... & Niazi, S. (2016). Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydrate Polymers*, 147, 444-454.

Silva, K. C. G., Cezarino, E. C., Michelin, M., & Sato, A. C. K. (2018). Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. *LWT – Food Science and Technology*, 89, 503-509

Singh, P., Medronho, B., Alves, L., da Silva, G. J., Miguel, M. G., & Lindman, B. (2017). Development of carboxymethyl cellulose-chitosan hybrid micro-and macroparticles for encapsulation of probiotic bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 175, 87-95.

Surawicz, C. M., & Brandt, L. J. (2016). Probiotics and fecal microbiota transplantation. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*. 10th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2339-43.

Šušković, J., Kos, B., Matošić, S., & Besendorfer, V. (2000). The effect of bile salts on survival and morphology of a potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(7), 673-678.

Tanner, G., Juhász, A., Florides, C. G., Nye-Wood, M., Békés, F., Colgrave, M. L., ... & Tye-Din, J. A. (2019). Preparation and characterization of avenin-enriched oat protein by chill precipitation for feeding trials in celiac disease. *Frontiers in nutrition*, 6, 162.

- Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., & Kopsahelis, N. (2019). Probiotics in food systems: Significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients*, 11(7), 1591
- Thakur, N., Saris, P. E., & Bhalla, T. C. (2015). Microorganisms associated with amylolytic starters and traditional fermented alcoholic beverages of North Western Himalayas in India. *Food Bioscience*, 11, 92-96.
- Thomas, L. V. (2016). Probiotics—the journey continues. *International Journal of Dairy Technology*, 69(4), 469-480.
- Torino, M.I., Font de Valdez, G. & Mozzi, F. (2015). Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 6 article 834.
- Turkmen, N., Akal, C., & Özer, B. (2019). Probiotic dairy-based beverages: A review. *Journal of Functional Foods*, 53, 62-75.
- Valero-Cases, E., & Frutos, M. J. (2015). Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and *in vitro* digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 824-828.
- Vanajakshi, V., Vijayendra, S. V. N., Varadaraj, M. C., Venkateswaran, G., & Agrawal, R. (2015). Optimization of a probiotic beverage based on Moringa leaves and beetroot. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1268-1273.
- Vandamme, T. F., Gbassi, G. K., Nguyen, T. L., & Li, X. (2016). Microencapsulation of probiotics. *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, 97-128.
- Wan, L. Y. M., Chen, Z. J., Shah, N. P., & El-Nezami, H. (2016). Modulation of intestinal epithelial defense responses by probiotic bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(16), 2628-2641.
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A. & Yang, Z. (2015). Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 119-126.
- Xavier-Santos, D., Bedani, R., Lima, E. D., & Saad, S. M. I. (2020). Impact of probiotics and prebiotics targeting metabolic syndrome. *Journal of Functional Foods*, 64, 103666.
- Xiao, Z., Li, W., & Zhu, G. (2015). Effect of wall materials and core oil on the formation and properties of styralyl acetate microcapsules prepared by complex coacervation. *Colloid and Polymer Science*, 293(5), 1339-1348..
- Yang, L.; Xia, Y.; Junejo, S.A.; Zhou, Y. Composition, structure and physicochemical properties of three coloured potato starches. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2018, 53, doi:10.1111/ijfs.13824.
- Zhu, F. (2017). Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems. *Food Chemistry*, 229, 542-552.