



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01172

(22) Data de depozit: 24.11.2010

(41) Data publicării cererii:  
29.06.2012 BOPI nr. 6/2012

(71) Solicitant:  
• ICA RESEARCH & DEVELOPMENT  
S.R.L., SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,  
ET.4, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• TOMA ALEXANDRINA,  
CALEA VĂCĂREȘTI NR.300, BL.1B, SC.2,  
AP.36, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• CIRIC IONUȚ ALEXANDRU, STR.  
ȘCOLILOR NR.85, BL.M1, SC.2, AP.24,  
BRĂILA, BR, RO;

• LANYI SZABOLCS ȘTEFAN, STR.MIKO  
NR.21, MIERCUREA CIUC, HR, RO;  
• ABRAHAM BEATA, STR. CULMEI BL.11,  
SC.C, AP.16, MIERCUREA CIUC, HR, RO;  
• DIMA ȘTEFAN, CALEA CĂLĂRAȘILOR  
NR. 56, AP. 411, BRĂILA, BR, RO;  
• BELA SIMON, STR. BECLEAN NR.13,  
ODORHEIUL SECUIESC, HR, RO;  
• ATTILA BODROGI, STR. OLARILOR N.5,  
AP.9, ODORHEIUL SECUIESC, HR, RO

(54) PROCEDEU DE MICROÎNCAPSULARE A BACTERIILOR  
PROBIOTICE PRIN USCARE CU PULVERIZARE  
ULTRASONICĂ

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de micro-încapsulare a bacteriilor probiotice printr-un procedeu de uscare prin pulverizare ultrasonică, cu o frecvență de 120 kHz, în camera de uscare, a unei instalații SonoDry750, la temperaturi cuprinse între minimum 130°C și maximum 170°C, o depresiune de 250 mm coloană de apă și un debit de aer caracterant de maximum 80 m<sup>3</sup>/h. Procedeu asigură caracteristici superioare produsului microîncapsulat și eficacitate în utilizarea lui ca adaos în produse funcționale destinate alimentației umane.

Revendicări: 9  
Figuri: 5

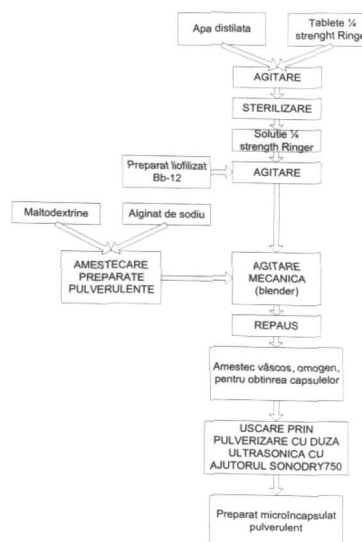
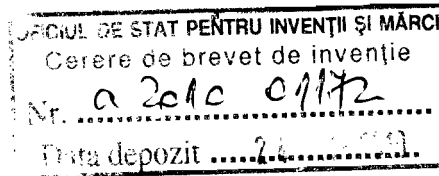


Fig. 5

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





## PROCEDEU DE MICROINCAPSULARE A BACTERIILOR PROBIOTICE PRIN USCARE CU PULVERIZARE ULTRASONICĂ

Prezenta propunere de invenție se referă la un procedeu de microincapsulare a bacteriilor probiotice, având la baza uscarea cu pulverizare ultrasonică. Domeniul caruia i se adresează propunerea de invenție îl constituie aplicarea biotehnologiilor pentru obținerea de preparate microbiologice, de bacterii probiotice, benefice pentru sănătatea oamenilor. Ele sunt utilizate în fabricarea produselor lactate cu proprietăți funcționale și cu grad ridicat de siguranță alimentară.

Microorganismele probiotice pot fi definite ca fiind microorganisme aflate sau introduse la nivel intestinal care au un efect benefic asupra organismului gazdă, prin îmbunătățirea echilibrului microflorei intestinale (Fuller 1991; Goldin 1998; Costin și Segal 1999; Gismondo et al. 1999). Numeroase beneficii aduse sănătății umane au fost identificate ca datorându-se consumului de produse probiotice. Dintre acestea sunt mai des amintite efectele antimutagenice și anticarcinogenice, proprietățile antiinfecțioase, imunostimulatoare, de reducere a colesterolului seric, de diminuare a intoleranței la lactoză precum și de îmbunătățire a randamentului de utilizare a principiilor nutriționale (Costin și Segal, 1999). Specii de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* și *Bifidobacterium lactis* sunt cele mai utilizate bacterii considerate a fi probiotice.

Cercetările efectuate asupra viabilității și capacității de supraviețuire a bacteriilor probiotice în tractul gastrointestinal și în produsele alimentare (în special în produse lactate acide) au arătat faptul că, în general, viabilitatea microorganismelor scade dramatic datorită expunerii la factorii de mediu neprielnici cum ar fi acizii, ionii hidrogen, oxigenul molecular sau diverși compuși antibacterieni (Dave și Shah 1997, Kailasapathy și Rybka, 1997; Hamilton-Miller et al., 1999). În plus, efectul benefic al microorganismelor probiotice apare atunci când ele ajung în intestinul gros în număr suficient și viabile, după ce au rezistat condițiilor de mediu mai sus amintite (Gilliland, 1989). Numărul minim de celule probiotice (ufc/g) care trebuie să existe în produs la momentul consumului pentru apariția unui efect terapeutic a fost cuantificat sub denumirea de "minimum of bio-value" (MBV) (Mortazavian et al. 2006). International Dairy Federation (IDF) recomandă ca acest indice să fie mai mare de  $10^7$  ufc/g, până în ultimul moment de valabilitate a produsului alimentar probiotic. În alte țări, precum Argentina, Paraguay și Brazilia standardul este de minimum  $10^6$  ufc/g dar se referă doar la bifidobacterii, iar în Japonia numărul total de celule probiotice trebuie obligatoriu să depășească valoarea de  $10^7$  ufc/g. De asemenea literatura consemnează  $10^6$  ufc/g (cu referire strictă la microorganismele probiotice) ca fiind valoare minimă pentru care un produs poate fi denumit probiotic, iar în cazul în care se face referire doar la bifidobacterii ca microorganisme probiotice valoarea minimă consemnata și acceptată este de  $10^7$  ufc/g. În afara de indicii MBV, a mai fost definit și indicele DI („daily intake”) care se referă la cantitatea totală zilnică de bacterii probiotice introduse în mod conștient și voluntar în organism, indice care este de asemenea determinant pentru eficacitatea unui tratament cu probiotice. Valoarea minimă a lui DI a fost stabilită la  $10^9$  celule viabile pe zi. (Shah et al. 1995, Kurman și Rasic, 1991). Tipul mediului de cultură utilizat în numărarea bacteriilor probiotice este de asemenea considerat ca fiind un factor deosebit de important în determinarea viabilității acestor celule, mai ales datorită gradului de selectivitate diferit al diverselor medii utilizate.

Pierderea viabilității bacteriilor în produsele alimentare (și în special în produsele fermentate) precum și acțiunea acizilor și a sărurilor biliare din tractul gastrointestinal a determinat numeroase studii și cercetări pentru găsirea unor metode noi și eficiente de îmbunătățire a viabilității bacteriilor probiotice.

**Microincapsularea** reprezintă una dintre cele mai noi și eficiente metode de menținere a viabilității bacteriilor probiotice la ora actuală. Din punct de vedere microbiologic, *microincapsularea* poate fi definită ca fiind procesul de captare/inglobare a celulelor de microorganisme prin acoperirea acestora cu unul sau mai multe straturi din anumiți hidrocoloizi, pentru delimitarea și protejarea celulei de acțiunea mediului exterior, într-un mod în care celula să poată fi eliberată în mediul intestinal (Sultana et al., 2000, Krasaekoopt et al., 2003, Picot și Lacroix, 2003).

Operația de microincapsulare reprezintă o metodă eficientă de creșterea a viabilității microorganismelor și ea are o importanță practică deosebită.

*Incapsularea* este definită în general ca o acțiune de acoperire perfectă a unei substanțe într-o altă substanță ce formează învelișul exterior, capsula în sine. **Microincapsularea** se referă la



realizarea operației de încapsulare la nivel micro (capsule cu dimensiuni mai mici de 1 mm și ajungând până la 2-4μm).

Asadar încapsularea reprezintă o protecție prin acoperire a unei substanțe cu o valoare superioară învelisului capsulei, dar care, fata de acest învelis, este de natura labilă, ușor distructibilă în anumite condiții de mediu.

Spre sfârșitul secolului al nouăsprezecelea un farmacist, Upjohn, a brevetat ceea ce și astăzi numim procedeul de drajeifiere. Particule relativ mari de substanță solidă sunt așezate într-un mixer de formă cilindrică și se pulverizează deasupra acestora o soluție lichidă. În general soluția lichidă este o soluție de zahăr în apă, iar procesul în sine presupune mai multe pulverizări și evaporări consecutive până când învelisul de zahăr atinge caracteristicile dorite. Procesul este utilizat și astăzi pe scară largă în tehnologia farmaceutică cu scopul de a realiza un învelis dulce pentru drajeurile anumitor medicamente. În industria alimentară acest procedeu s-a extins rapid la diverse tipuri și mărci de bomboane.

Începând cu sfârșitul secolului al nouăsprezecelea au fost studiate diverse procedee de încapsulare de către comunitatea științifică internațională, plecând de la drajeifierea lui Upjohn, menționând metode precum uscarea prin pulverizare, deshidratarea cu solvenți, încapsularea prin extrudare, încapsularea în pat fluidizat, extruderea centrifugală, coacervarea, formarea clatrților, procedeul de pulverizare răcire și ajungându-se astăzi la metode precum **uscarea prin pulverizare cu ajutorul ultrasunetelor**, metoda utilizată la microîncapsularea unor materiale biologice.

Majoritatea specialiștilor consideră că pionieratul în domeniul microîncapsulării a fost realizat în al treilea deceniu al secolului nostru de către National Cash Register Company (Dayton, Ohio). Folosind procedeul chimic numit coacervare (separare de fază), National Cash Register a dezvoltat o metodă de a absorbi un colorant într-un învelis de gelatină reticulată. Procesul omologat de acestia a fost extins la scară comercială în 1954 pentru producerea primei hârtii autoimprimante. În 1981 producția de hârtie autoimprimantă la nivel mondial atinsese deja 500000 de tone pe an.

Descoperirea celor de la National Cash Register și noul proces de coacervare au generat în jurul lor un mare interes în anii '50 iar procesul de încapsulare în sine a început să se extindă și în alte domenii precum agricultura, industria cosmetică, electronică și industria alimentară. Procesul de coacervare în sine a fost studiat și, în anumite domenii, a fost considerat nu numai aplicabil cât mai ales economic în comparație cu procesele folosite anterior. În alte domenii însă procesul nu a fost aplicat datorită limitărilor tehnice pe care acesta le dovedea. Însa acest procedeu își rezervă meritul de a fi deschizător de drum către viitoarele tehnologii de încapsulare pe care noi astăzi le aplicăm și le dezvoltăm.

Pentru încapsularea organismelor vii, a bacteriilor în special, se folosesc ca metode de bază *emulsionarea-gelifierea, extrudarea sau uscarea prin pulverizare și, mai nou, utilizarea patului fluidizat.*

Toate aceste procedee tehnice mai mult sau mai puțin avansate trebuie susținute însă de utilizarea unor polimeri cât mai performanți și adaptați consumului uman direct. Siguranța consumului, proprietățile de gelifiere precum și rezistența la acțiunile sucului gastric și a sărurilor biliare sunt principalele criterii de alegere a biopolimerilor încapsulanți.

În momentul de față pe primul loc ca utilizare în scopuri de încapsulare a organismelor vii este alginatul (de sodiu sau de calciu). Sunt de asemenea testate substanțe precum amidonul, xantanul, gelanul, caragenanul, gelatina, chitosanul, făina de roscova, proteinele de zer și chiar clorura de calciu.

În cadrul ICA Research & Development București s-au efectuat lucrări de microîncapsulare a bacteriilor probiotice prin metoda clasică a gelifieii și a extrudării simple, apoi prin uscare prin pulverizare.

S-a concluzionat că primele două tehnici de încapsulare (extrudarea și emulsionarea) nu sunt fiabile pentru aplicații industriale, iar produsul rezultat în urma aplicării acestor tehnici nu poate fi utilizat în scopul urmărit (microcapsulele obținute erau neuniforme, foarte higroscopice și foarte greu de uscat).

Tehnica uscării prin pulverizare a generat însă rezultate net superioare. În funcție de biopolimerul încapsulant sau de amestecul de biopolimeri, în funcție de concentrația acestora și natura gelului generat, această tehnică a condus la obținerea de produse omogene din punct de vedere structural și compozițional, dar și la rezultate ușor reproductibile.



24-11-2010

Avantajul uscării prin pulverizare constă de asemenea și în faptul că **aceasta poate fi aplicată cu ușurință și la nivel industrial.**

*Uscarea prin pulverizare* este probabil una dintre cele mai vechi tehnici de încapsulare și este și în prezent cea mai utilizată tehnică de preparare a aditivilor alimentari stabili uscați și în special a aromelor alimentare. Aromele obținute prin acest procedeu sunt disponibile pe piața încă din anii '30. Procesul este economic, flexibil, adaptabil utilizării industriale, un avantaj constituindu-l și faptul că pe piața există o gamă largă de utilaje concepute special în acest scop. În general procedeu se realizează în trei etape. O aromă, de obicei un ulei (dar se pot utiliza și arome hidrosolubile) este amestecat cu un polimer comestibil precum gelatina, gumele vegetale, amidon modificat, dextrina sau proteine negelifiante, de obicei într-un raport de 1:4 (aroma: substanțe de fixare). Se adaugă un emulsionant și amestecul este omogenizat pentru a se produce o emulsie ulei în apă cu o ușoară structură micelară. Emulsia este atomizată și uscată utilizând una dintre metodele în care un aerosol se introduce într-o coloană de aer cald, aflată într-o cameră de uscare. Picăturile capătă o formă sferică, cu uleiul de aromă gravitând în centrul picăturii iar soluția apoasă formează învelișul particulei. Evaporarea rapidă a apei din înveliș face ca temperatura să se mențină sub punctul de fierbere al apei chiar și în coloanele cu aer fierbinte cu temperaturi deosebit de ridicate. Din fericire expunerea la temperaturi ridicate în camera de uscare este foarte scurtă, de ordinul câtorva secunde. Aromele hidrosolubile (sau alte ingrediente alimentare) pot fi de asemenea fixate sau imobilizate cu ajutorul anumitor hidrocoloizi, dar aceste particule nu prezintă o separație bine definită între substanța de încapsulat și substanța încapsulantă. Se menționează unele cazuri în care cele două substanțe au realizat un amestec omogen înainte de uscare.

Particulele uscate prin pulverizare au de obicei dimensiuni sub 100 μm, fapt care le conferă o foarte bună solubilitate sau dispersabilitate în apă. Dacă este necesar, particulele uscate prin pulverizare se pot obține gata aglomerate sau granulate, precum în cazul amestecurilor uscate, unde se cere și o cât mai mare uniformitate a dimensiunilor particulelor componente.

Odată cu apariția aromelor uscate prin pulverizare, fenomenul oxidativ a fost redus semnificativ la fel ca și fenomenul de evaporare a substanțelor volatile. Straturile de acoperire de natură coloidală polimerică dovedesc a realiza o anumită protecție asupra straturilor interne de substanță activă. Inițial, pentru acest tip de substanțe, termenul folosit a fost de "arome captive" sau "arome protejate". Mai apoi, la începutul anilor 50 s-a consacrat termenul de "arome încapsulate".

#### **Metode de microîncapsulare a bacteriilor probiotice**

Tehnologia încapsulării probioticelor se poate împărți în două părți:

- a) Microîncapsularea probioticelor în soluția încapsulantă (microîncapsularea propriu-zisă)
- b) Uscarea capsulelor umede obținute, în scopul obținerii de pudră sau granule.

##### *a) Microîncapsularea propriu-zisă*

Tehnicile de extrudare sau emulsionare, denumite și metoda picăturii și respectiv metoda în două faze sunt două dintre principiile de bază a încapsulării.

##### *Tehnică prin extrudare.*

Metoda extrudării este tehnica cea mai veche și cea mai des utilizată pentru producerea capsulelor de hidrocoloid. În general este o metodă ieftină și ușor de folosit la nivel de laborator, fiind totodată și metoda care afectează în cea mai mică măsură viabilitatea celulelor bacteriene. Se spune că termenii definitorii pentru această metodă sunt biocompatibilitatea și flexibilitatea (Tanaka et al., 1984, Martinsen et al 1989). Din păcate această tehnică nu poate fi aplicată în producția industrială, datorită greutateii cu care se formează particulele și vitezei reduse de lucru.

##### *Tehnică prin emulsionare*

Tehnica de emulsionare a fost aplicată cu succes pentru microîncapsularea bacteriilor lactice probiotice. Spre deosebire de tehnica extrudării, această tehnică poate fi ușor transpusă la nivel industrial, iar dimensiunea particulelor este considerabil mai mică (25 μm-2 mm).

Metoda necesită însă costuri ridicate pentru realizarea unor capsule de calitate bună, în comparație cu metoda extrudării datorită în primul rând folosirii unui ulei pentru formarea emulsiei. În această tehnică, o cantitate mică de amestec polimer-celule este adăugată unui volum mare de ulei (se poate folosi ulei de soia, de floare soarelui, de porumb sau orice alt ulei de natură vegetală). Soluția rezultată trebuie omogenizată apoi printr-o agitare adecvată, până când se formează o emulsie apă



in ulei. Pentru o omogenizare cat mai buna se pot adauga emulgatori precum Tween 80, in concentratii 0,2% (recomandare facuta de Sheu si Marshal, 1993). Odata emulsia formata, polimerul solubil este insolubilizat prin adaugare de clorura de calciu. Dimensiuni cat mai mici ale particulelor de apa din emulsie vor conduce la dimensiuni mici ale capsulelor obtinute.

*b) Uscarea capsulelor umede obtinute, cu scopul obtinerii de pudra sau granule*

Uscarea capsulelor obtinute cu scopul obtinerii de pudra sau granule poate fi realizata prin diferite metode. Dintre aceste metode cele mai importante sunt liofilizarea, *uscarea prin pulverizare si uscarea in pat fluidizat*. In general procesul de uscare in sine afecteaza intr-o anumita masura granulele formate, reducand viabilitatea acestora. In procesul de liofilizare temperatura afecteaza foarte putin produsul finit, in comparatie cu celelalte procese de uscare. Aceasta metoda este insa scumpa si greu de adaptat la nivel de utilizare industriala.

*Metoda cea mai eficienta* pentru obtinerea de capsule a fost considerata uscarea prin pulverizare, deoarece aceasta are costuri relativ scazute si poate fi utilizata pentru uscarea unor volume mari de solutii. In acest caz se inregistreaza insa o scadere a viabilitatii microorganismelor incapsulate, datorita deshidratarii si incalzirii simultane.

Se pare insa ca o solutie pentru utilizarea acestei metode este cea prezentata de Picot si Lacroix in 2003. Procedura a fost considerata ca fiind economica datorita faptului ca a reusit mentinerea viabilitatii celulelor intr-un foarte mare procent. Metoda consta in acoperirea unor picaturi de grasime lactata ce contine in interior bacterii probiotice liofilizate cu polimeri proveniti din randul proteinelor zerului, in conditiile utilizarii odata cu uscarea prin pulverizare a anumitor emulgatori. Dimensiunile particulelor de cultura liofilizata stau la baza dimensiunilor particulelor obtinute in urma procesului de uscare. Pentru o incapsulare buna, aceste particule trebuie sa fie mai mari decat celulele (2-4µm) dar mai mici decat particulele de grasime ce urmeaza a le ingloba (10-15µm)..

**Procedeu propus pentru brevetare** se refera la prepararea solutiei microincapsulate continand bifidobacterii si uscarea preparatului intr-o instalatie de uscare prin pulverizare cu ultrasunete.

Experimentele de obtinere a bacteriilor probiotice (bifidobacteriilor) microincapsulate s-au realizat pe o instalatie de laborator, SonoDry750, la care alimentarea cu produs in camera de uscare se realizeaza prin pulverizare cu o duza ultrasonica.



Fig. Nr. 1

Instalatie de uscare prin pulverizare cu ultrasunete

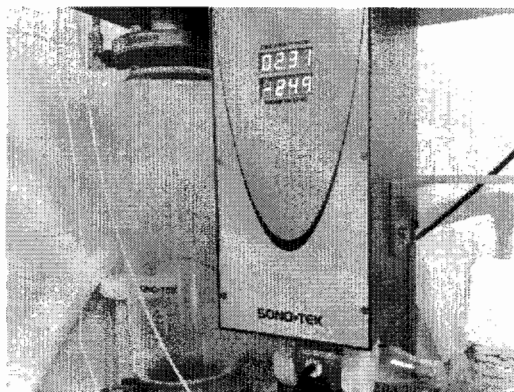


Figura nr. 2

In cazul acestui procedeu de uscare a capsulelor obtinute, temperatura este factorul determinant al procesului, fiind factor restrictiv, si care prezenta atat o limita inferioara cat si una superioara.

Limita inferioara este realizata de procesul de uscare in sine, acesta ne-putandu-se realiza complet decat in cazul in care o temperatura minima de uscare este atinsa. Acest minim de temperatura este determinat prin analiza procesului de uscare si ea este suficienta daca pe peretii turnului de uscare nu se vor lipi particule de produs decat in cantitati nesemnificative si daca vasul de recuperare a fazei lichide, situat imediat sub turnul de uscare, va fi complet gol la sfarsitul unui proces de uscare.



Limita superioară de temperatură se determina prin analiza viabilității bifidobacteriilor din pulberea recuperată. Importanta este relația dintre temperatura de uscare și viabilitatea bacteriilor, astfel încât trebuie aleasă cea mai mică temperatură la care procesul de uscare se realizează bine în uscătorul SonoDry750.

Microcapsulele de bifidobacterii s-au obținut prin realizarea unui preparat compus din:

- Soluție ¼ strength Ringer
- 11% preparat bacterian liofilizat
- 2% maltodextrine.

Factorii variabili din experimente au fost: frecvența duzei de ultrasonare, temperaturile de intrare și de ieșire din camera de uscare, puterea optimă aplicată duzei de ultrasonare utilizată pentru alimentarea camerei de uscare, debitul de aer circulant.

Alegerea variantei optime a fost condiționată de optimizarea procesului tehnologic pentru obținerea randamentului maxim în produs, și de viabilitatea bacteriilor microincapsulate.

### Exemplu nr. 1.

#### Frecvența duzei de pulverizare a produsului în camera de uscare în instalația SonoDry750 - 60 kHz

- temperaturi de intrare a aerului în instalație 90, 130, 150, 170 °C.
- temperatura de ieșire a aerului din instalație a fost reglată automat, în funcție de debitul produsului și viteza de uscare, și a fost cuprinsă între 70 și 96/- 5°C.
- Preparatul supus uscării: Soluție ¼ strength Ringer; 11% preparat bacterian liofilizat; 2% maltodextrine, 2% alginat de sodiu
- puterea optimă aplicată duzei de ultrasonare utilizată pentru alimentarea camerei de uscare cu produs ... 11 wați;
- debitul de aer circulant în instalația de uscare prin pulverizare, maxim, 80 m<sup>3</sup>/h;
- presiune ...-250mm coloana de apă

SonoDry Trends Chart

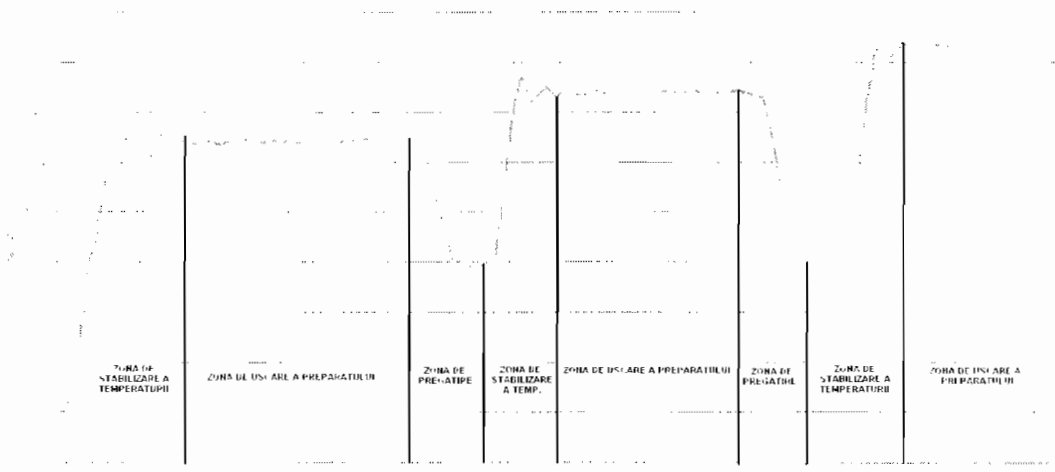


Figura nr. 3. Diagrama procesului de uscare în uscătorul SonoDry750, cu duza de 60kHz

Din diagramă se poate observa faptul că s-au realizat trei procese de uscare succesive, fiecare diferind de cel anterior prin temperatură.

În urma testării s-a concluzionat faptul că temperatura de 130°C nu este potrivită, deoarece s-au întâmpinat dificultăți în uscarea produsului. Reglarea temperaturii de intrare a aerului la 150°C a



24-11-2010

condus la rezultate mai bune din punct de vedere fizic. Preparatul a fost mai uscat, dar s-a produs o peliculă pe partea superioară a turnului de uscare. Din punct de vedere al procesului de uscare, la 170°C s-au obținut rezultatele dorite, adică un preparat uscat, nelipicios. Viabilitatea bacteriilor după uscare a fost însă mai mică.

Tabel nr. 1 Viabilitatea bacteriilor lactice din produsul obținut prin aplicarea diferitelor regimuri de uscare cu duza de 60 KHZ

Nr. crt.	Temperatura de intrare a aerului (°C)	Viabilitatea inițială (cfu/g) - $v_i$	Viabilitatea preparatului obținut (cfu/g) - $v_f$	Grad de scădere a viabilității ( $v_i/v_f$ )
1.	130	$95 \times 10^{10}$	$28 \times 10^9$	34
2.	150	$95 \times 10^{10}$	$24 \times 10^9$	39
3.	170	$95 \times 10^{10}$	$23 \times 10^9$	41

Microcapsule obținute nu trebuie să depășească dimensiunea de 30 de micrometri, pentru a nu fi detectate de papilele gustative, atunci când sunt introduse în diferite produse.

Duza de 60kHz poate genera capsule de dimensiuni sub limita sau apropiate de 30 de microni.

Deși rezultatele privind viabilitatea bacteriilor în cazul utilizării duzei de 60 kHz sunt bune (tabel nr. 1), s-a constatat că microincapsularea nu s-a realizat complet, lucru demonstrat prin testul de simulare a tractului gastrointestinal [în urma cultivării pe mediu MRS-NNLP, în anaerobioză, nici un preparat din cele trei nu a prezentat activitate biologică la diluția D(-5)].

**Exemplu nr. 2. Frecvența duzei de pulverizare a produsului în camera de uscare în instalația SonoDry750 - 120 kHz**

- temperaturi de intrare a aerului în instalație 130°, 150°, 170 °C.
- temperatura de ieșire a aerului din instalație a fost reglată automat, în funcție de debitul produsului și viteza de uscare, și a fost cuprinsă între 70 și 96/- 5°C.
- Preparatul supus uscării: Soluție ¼ strength Ringer; 11% preparat bacterian liofilizat; 2% maltodextrine, 1% alginat de sodiu
- puterea optimă aplicată duzei de ultrasonare utilizată pentru alimentarea camerei de uscare cu produs ... 11 wați;
- debitul de aer circulant în instalația de uscare prin pulverizare, maxim, 80 m<sup>3</sup>/h;
- presiune ...-250mm coloana de apă
- debitul optim setat pentru pompa seringă de 10 ml este 4ml/min

În acest caz a fost exclusă varianta de uscare în regim minimal, cu temperatura de intrare a aerului de 90°C. S-a menținut constant debitul produsului lichid, la 4ml/min.

Experimentul în care temperatura aerului la intrarea în camera de uscare a fost 130°C, utilizând o frecvență a ultrasunetelor de 120 KHz, a evidențiat un regim de uscare nesatisfăcător, datorită lipirii produsului pe partea superioară a camerei de uscare.

Aplicarea unui proces de uscare la care temperatura de intrare a aerului în camera de uscare a fost setată la 150°C (figura nr. 4) s-a desfășurat în condiții bune, fără ca produsul să fie lipit de pereții uscătorului iar randamentul a fost mai bun



SonoDry Trends Chart

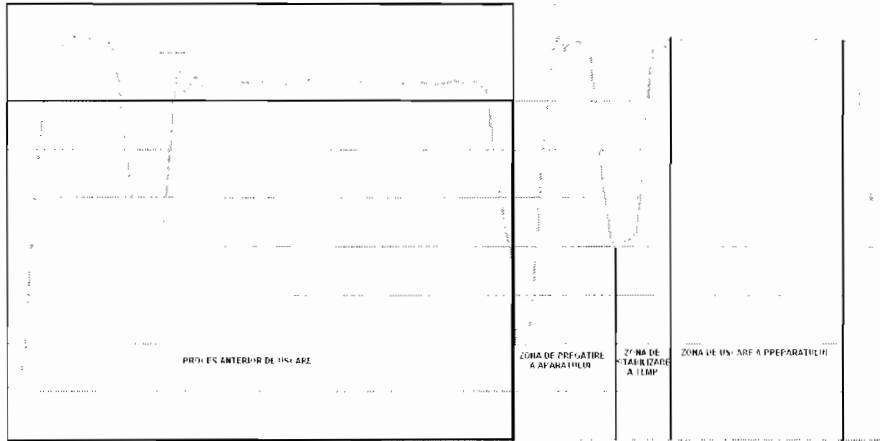


Figura nr.4. Diagrama procesului de uscare în uscătorul SonoDry750, la 150 °C și la 170°C

În cazul variantei de proces tehnologic cu ridicarea temperaturii aerului la intrarea în camera de uscare la 170 °C, uscarea a decurs în condiții foarte bune, dar o parte din produsul obținut, cu particule foarte mici, au trecut de primul ciclon și au aderat pe vasul de separare a celui de-al doilea ciclon. În figura 4. sunt prezente ciclurile de uscare la 150°C și la 170°C. Se poate observa că ciclul de uscare la 170°C este ușor mai instabil decât cel la 150°C. Viabilitatea bacteriilor probiotice după procesul de microincapsulare și uscare este prezentată în tabelul nr.2.

**Tabel nr. 2.** Viabilitatea bacteriilor lactice din produsul obținut prin aplicarea diferitelor regimuri de uscare cu duza de 120 KHZ

Nr. crt.	Temperatura de uscare a amestecului (°C)	Viabilitatea inițială (cfu/g) - $v_i$	Viabilitatea preparatului obținut (cfu/g) - $v_f$	Grad de scădere a viabilității ( $v_i/v_f$ )	Randament obținut % (cantitate produs uscat g/100ml produs lichid)
1.	130	$165 \times 10^{10}$	$82 \times 10^9$	20	2,21
2.	150	$165 \times 10^{10}$	$21 \times 10^9$	78	2,93
3.	170	$165 \times 10^{10}$	$1 \times 10^9$	1650	2,88

Se constată astfel că regimul optim de temperatura a aerului utilizat în procesul de uscare este de 150°C±10°C. Aceasta valoare asigură un proces satisfăcător atât din punct de vedere al randamentelor obținute cât și din punct de vedere microbiologic.

*Varianta optimă de microincapsulare a bacteriilor probiotice prin uscare este aceea în care se utilizează, pentru alimentarea produsului în camera de uscare, o duza de pulverizare ultrasonică, având o frecvență de 120kHz. În produsul supus uscării se utilizează alginat în proporție de 1%.*

#### **Tehnologia de microincapsulare**

Procesul tehnologic privind microincapsularea bacteriilor probiotice se desfășoară conform schemei tehnologice prezentate în figura nr. 5

Noutatea propunerii de invenție constă în aplicarea unui procedeu de uscare a microcapsulelor de bacterii probiotice (bifidobacterii) într-o instalație de uscare prin pulverizare





ultrasonica. Prin acest sistem are loc și o emulsifiere al preparatului biologic cu bacterii probiotice, ceea ce determină obținerea unor microcapsule de dimensiuni mici, de cca. 30  $\mu\text{m}$ . Dimensiunea microcapsulelor este importantă în cazul utilizării acestora la fabricarea produselor lactate, prin adăos direct în produsul finit sau în laptele ce urmează a fi fermentat, deoarece ele nu trebuie să fie detectate de papilele gustative.

Din punct de vedere al randamentului la uscarea microcapsulelor, temperatura optimă este cuprinsă între 150-170°C, iar d.p.v. al viabilității bacteriilor după procesul de uscare, temperatura optimă este cuprinsă în intervalul 130-150°C. Frecvența optimă a duzei de pulverizare ultrasonica a produsului în camera de uscare din instalația SonoDry750 este de 120 kHz.



A handwritten signature in black ink, appearing to be a stylized name, located to the right of the circular stamp.

## Bibliografie

1. Brigidi P., Swennen E., Vitali B., Rossi M., 2003, „PCR detection of Bifidobacterium strain and Streptococcus thermophilus in feces of human subjects after oral bacteriotherapy and yogurt consumption”. *Int J food Microbiol*, 81:203-209
2. Chem, M. J., Chen, K., N., 2007. „Applications of Probiotic Encapsulation in Dairy Products in Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems”, Edited by J. M. Lakkis, Blackwell Publishing Ltd., , p. 83-110
3. Costin G. M., 2007, „Aspecte generale privind sistemul digestiv, functiile microflorei intestinale si produsele lactate functionale” in „Produse lactate functionale”, Editor G. M. Costin, Editura Academica, Galati
4. Elli, M., Callegari, M. L., Ferrari S., Cattivelli D., Soldi S., Morelli L., Goupil Feuillerat, N., Antoine, J-M., 2006, „Survival of yogurt bacteria in human gut”. *Appl Environ Microbiol*, 72:5113-5117
5. Fuller M. F., 1991, „In vitro digestion for Pigs and Poultry”, C.A.B International, Oxfordshire
6. Hou, R. C. W., Lin M. Y., Wang M. C., Tzen J. T. C., 2003, „Increase of viability of entrapped cells of Lactobacillus delbruekii ssp. Bulgaricus in artificial oil emulsions”. *Journal of Dairy Science* 86: 424-428
7. Krul C., Humbold C., Philipp C., et all. 2002, „Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucozinolate) by the human colonic microflora in a dynamic in vitro large intestinal model”. *Carcinogenesis*; 23:1011
8. Lindwall S., Fonden, R., 1984, „Passage and survival of L.Acidophilus in the human gastrointestinal tract”. *Annu.Bull.Int. Dairy Fed.* 21, 179
9. Maitrot, H., Chou, Paquin C., Lacroix C., Champagne, C. P., 1997. „Production of concentrated freeze-dried cultures of Bifidobacterium longum in k-carrageenan-locust bean gum gel”. *Biotechnology Techniques* 11 (7): 527-531
10. Makivuoikko H., Nurmi J., Nurminen P., Stowell J., Rautonen N., 2005. „In vitro effect on poydextrose by colonic bacteria and Caco-2 cell cyclooxygenase gene expresion”. *Nutr. Cancer* 52:93-103
11. Makivuoikko, H., Saarinen, M., Ouwehand, A., and Rautonen, N., 2006, „Effects of lactose on colon microbial community structure and function in a four-stage semicontinuous culture system”. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2056-2063
12. Makivuoikko, H., Kettunen H., Saaarinen M., Kamiwaki, T., Yokoyama Y., Stowel J., Rautonen, N., 2007. „The effect of cocoa and polydextrose on bacterial fermentation in gastrointestinal tract simulation”. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71 (8), 1834-1843
13. Marteau P., Minekus M., Havenaar R., Huis In't Veld J. H. J. 1997. „Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine:validation and the effects of bile”, *J. Dairy.Sci.* 80:1033-1041
14. Marteau P., Minekus M., Havebaar R., Huis in't Veld J.H., 1997, „Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine; validation and effects of bile”, *J. Dairy Sci.* 80 , 1031-1037
15. Marteau P., Gerhardt M. F., Myara A., Bouvier E., Trivin F., Rambaud J. C., 1995, „Metabolism of bile salts by alimentary bacteria during transit in the human small intestine”, *Microb. Ecol. Health Dis.* (8), 151-157
16. Ouwehand A. C., Salminen S., Arvola T., Ruesco T., Isolauri E, 2004. „Microbiota composition of the intestinal mucosa: association with fecal microbiota”. *Microbiol Immunol* , 48: 497-500
17. San, W and Griffiths, M.W., 2000. „Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juse following immobilization in gellan-xanthan beads”. *International Journal of Food Microbiology* 61: 17-25
18. Tannock G. W., Tangerman A., van Schaik A., McConnell M. A., 1994 „Deconjugaison of bile acids by lactobacilli in the mouse small bowel”. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 3419-3420
19. Zoetendal E. G., von Wright A., Vilpponen-Salmela T., Ben Amor, K., Akkermans, A. D. L., de Vos W. M., 2002. „Mucosa associated bacteria in the human gastrointestinal tract uniformly



12

*[Handwritten signature]*

distributed along the colon and differ from the community recovered from feces". *Appl. Environ Microbiol*, 68:3401-3407

20. Bergmaier D, Champagne CP, Lacroix C, (2003). Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *J*

21. Bergmaier D, Champagne CP, Lacroix C, (2005). Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *J Appl Microbiol* 98: 272-284.

22. Chan, E. S., Zhang, Z., Bioencapsulation by compression coating of probiotic bacteria for their protection in an acidic medium, *Process Biochemistry*, (2005) Vol. 40, No. 10, p 3346-3351

23. Chen, K., Chen, M., Liu, J., Lin, C., Ahiu, H., Optimisation of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation, *Journal of Food Science*, (2005), Vol 70, Issue 5, M260-M266

24. Cîrîc AI "Techniques used for encapsulation of probiotic bacteria" (prezentare) la AI IX-lea simpozion cu participare internationala de chimia colorizilor si suprafetelor, Galati, mai 2008

25. Cîrîc AI Costin G.M. Ph.D Microencapsularea bacteriilor probiotice.. Principii generale. Structura microcapsulelor\_ in *Bulletin de Informare in Industria Laptelui*, nr. 4/2007, Ed. Academica, Galati

26. Cîrîc AI Tehnici de incapsulare a produselor alimentare in *Bulletin de Informare in Industria Laptelui*, nr 1/2004, Ed. Academica, Galati

27. Cîrîc, AI Cercetari asupra produselor sinbiotice in *Bulletin de Informare in Industria Laptelui*, no 1/2003, p 58 – 66 , Ed. Academica, Galati

28. Costin G.M., (2005), "*Produse lactate fermentate*", Editura Academica, p.187-216

29. Costin G.M., Segal R., (1999), "*Alimente funcționale*", Editura Academica, p.113-153

30. Costin GM, Segal R (1999). Alimente funcționale. *Alimentele si sănătatea*, Ed.Academica Galați

31. Daniells, S., Omega-3 encapsulation in chitosan gets study boost, <http://www.foodnavigator.com/news/ng.asp?id=79355-chitosan-omeg32.a-encapsulation>

33. Dave RI, Shah NP (1996). Evaluation of media for selective enu meration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruekii* spp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and bifi- dobacteria. *J Dairy Sci*. 79: 1529-1539.

34. Dellaglio F, de Roissard H, Torriani S, Curk MC, Janssens D (1994) Caractéristiques générales des bactéries lactiques. în : *Bactéries lactiques*. Vol 1. De Roissard H et Luquet FM (ed.). Loric: Uriage. 25-116.

35. Dima St Ph. D, Beliciu C, Cîrîc AI Studiul folosirii alginatilor in procesul de bioencapsulare prin emulsionare gelifiere , în vol. " Alimentele in Mileniul III", p. 250-256, Ed. Academica, Galați, 2000

36. Dima St., Bahrim G, „Intelligent invertase micro and nanocapsules make and use”, (2007), *Roumanian Biotechnological Letters*, 12, 3, p. 3287-3293

37. Dima St., Bahrim G, Gheteu M, " A new procedure for the bioencapsulation of the enzymes with hydrocolloids ", *Annals of University of Timisoara, series CHEMISTRY* 12(3) 2003, p.857-862

38. Dimantov A, Greenberg M, Kesselman E.,Shimoni (2003). Study of high amylase corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model systems. *Innov. Food Science and Technol.*5:93-100

39. Dimantov A, Kesselman E, Shamanic E (2004) Surface charracterization and dissolution properties of high amylase starch pectin coatings. *Food Hydrocol.* 18: 29-37



13  
M.K.

40. Doleyres, Y., Lacroix, C., Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection, *International Dairy Journal*, 15 (2005) 973-988
41. Fuller R (1991). Probiotics in human medicine. *Gut* 32: 439-442.
42. Gilliland SE (1989). A review of potential benefits to consumers. *J. Dairy Sci.* 72: 2483-2494.
43. Gismondo MR, Drago L, Lombardi A (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int J Antimicrob Agents*. 12: 287-292
44. Goldin BR (1998). Health benefits of probiotics. *British J Nutr.* 80: 203-207.
45. Gouin S (2004). Microencapsulation-industrial appraisal of existing technologies and trend. *Trends Food Sci Technol.* 15: 330-347
46. Groboillot A, Boadi DK, Poncelet D, Neufeld RJ, (1994). *Immobilization of cells for application in the food industry.* *Crit Rev Biotechnol* 14: 75-107.
47. Kailasapathy K, Rybka S (1997). *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.: their therapeutic potential and survival in yogurt. *Aust J Dairy Technol.* 52: 28-35
48. Kailasapathy, K., Godward, G., Talwalkar, A., Micro-encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch as a dairy food delivery system, Session 73, Dairy Foods: Probiotics and bioactive components in milk, 9:00 AM - 10:45 AM, 2002-06-18 Room 212
49. Kailasapathy, K., Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications, *Curr. Issues Intest. Microbiol.* (2002) 3:39-48
50. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int Dairy J* 14: 737-743
51. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt, *Int Dairy J.* 13:3-13
52. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt, *International Dairy Journal*, 13 (2003) p 3-13
53. Kritchevsky D (1995). Epidemiology of fiber, resistant starch and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev.* 4: 345-352
54. Lankaputhra WEV, Shah NP (1995) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cult. Dairy Prod. J.* 30:2-7.
55. Lee KI, Heo TR (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Appl Environ Microbiol.* 66: 869-973
56. Lee K, Moon SH, (2003). Growth kinetics of *Lactococcus lactis* ssp. *Diacetylactis* harboring different plasmid content. *Current Microbiol* 47: 17-21.
57. Martien A, Skjak-Braek C, Smidsrod (1989), Alginate as immobilization material: 1. correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng* 33:79-89
58. Masson F, Lacroix C, Paquin C (1994) Direct measurement of pH profiles in gel beads immobilizing *Lactobacillus helveticus* using a pH sensitive microelectrode. *Biotechnol. Tech.* 8:551-556.
59. Mortazavian, AM, Sohrabvandi S (2006c). *Probiotics and food Probiotic products.* Eta Publication, Iran



60. Palacios, P., Burgos, J., Hoz, L., Sanz B., Ordonez, J. A., (1991), *Study of substances released by ultrasonic treatment from Bacillus stearothermophilus spores*, *J. Appl. Bacteriol.* 71, 445-451
61. Picot A, Lacroix C (2003). Effect of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. *Int Dairy J.* 13: 455-462
62. Picot A, Lacroix C (2003). Effect of dynamic loop mixer operating conditions on O/W emulsion used for cell encapsulation. *Le lait* 83: 237-250
63. Rueckert A, Ronimus RS, Morgan HW, (2005). *Development of a rapid detection and enumeration method for thermophilic bacilli in milk powders*. *J Microbiol Methods* 60: 155-167.
64. Sala F.J., Burgos J., Condon, S., Lopez, P., Raso, J., (1997) "Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes", in GOULD G. W., (Ed), *New methods of food preservation*, Blackie Academic, Professional, London, p.176-204
65. Sendra, E., Fazos, P., Lario, Z., Fernandez-Lopez, J., Sayas-Barberá, E., Pérez-Alvarez, J.A., *Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria*, *Food Microbiology*, 25 (2008), 13-21
66. Shah NP, Lankaputhra WEV, Britz M, Kyle WSA (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *Int Dairy J.* 5: 515-521
67. Shah NP, Rarula RR (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Aust J Dairy Technol.* 55: 139-144
68. Sheu TY, Marshall RT (1991) Improving culture viability in frozen desserts by microencapsulation. *J Dairy Sci* 74:107-111
69. Sheu TY, Marshall RT (1993) Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate gel, *J. Food sci.* 54:557-561
70. Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int J Food Microbiol.* 62: 47-55
71. Sunohara H, Ohno T, Shibata N, Seki K (1995). Process for producing capsule and capsule obtained thereby. *US Patent.* 5: 478-570
72. Tanaka H, Masatose M., Veleky IA (1984), Diffusion characteristics of substrates in calcium alginate beads. *Biotechnol Bioeng.* 26: 53-58
73. Truelstrup-Hansen L, Allan-Wojtas PM, Jin YL, Paulson AT (2002). Survival of free and calcium-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* ssp in simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol.* 19, 35-455
74. Vaughan, E, E., Heilig, H,G,H,J., Ben-Amor, K., dVos, W., Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches, *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (2005) 477-490
75. Wenrong S, Griffiths MW (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *Int J Food Microbiol.* 61: 17-26
76. US Patent No 6,592,863
77. US Patent No. 5,897,897



## REVEDICARI

1. Procedeu de microincapsulare a bacteriilor probiotice prin uscare, avand la baza pulverizarea ultrasonica a *produsului microincapsulat* care intra in camera de uscare a unei instalatii de uscare SonoDry750.
2. Produsul pentru uscat se obtine prin microincapsularea bacteriilor probiotice (bifidobacteriilor) intr-un amestec de solutie ¼ strength Ringer; 11-12 % preparat bacterian liofilizat; 1- 2% maltodextrine, 1-2 % alginat de sodiu.
3. Alimentarea cu produs de bacterii probiotice microincapsulate in camera de uscare a instalatiei se realizeaza printr-o duza de pulverizare ultrasonica cu o frecventa de 120 kHz.
4. Limitele de temperatura la intrarea produsului in camera de uscare a instalatiei, conform procedului de la pct. 1 sunt de min.130 ° C si max. 170 ° C
5. Temperatura de iesire a aerului din instalatie functie de debitul produsului si viteza de uscare, conform procedului de la pct. 1 este cuprinsa intre 70 si 96/- 5°C.
6. Debitul de aer circulant în instalatia de uscare prin pulverizare, conform procedului de la pct. 1 este de maxim 80 m<sup>3</sup>/h;
7. Presiunea de lucru conform procedului de la pct. 1 este de ...-250mm coloana de apa
8. Procedeu de microincapsulare a bacteriilor probiotice intr-o instalatie de uscare prin pulverizare ultrasonica, care functioneaza la parametrii conform pct. 3-7, asigura o viabilitate a produsului uscat cuprinsa intre 20 si 28%.
9. Concentratia de bacterii probiotice viabile in produsul microincapsulat, conform pct. 8, este cuprinsa intre 10<sup>9</sup> si 10<sup>10</sup> bacterii /gram.



10  
[Signature]

Figura nr.5. Schema tehnologică de obținere a bacteriilor lactice microincapsulate.

