



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00482**

(22) Data de depozit: **07/08/2019**

(41) Data publicării cererii:
26/02/2021 BOPI nr. **2/2021**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA "DUNĂREA DE JOS"**
DIN GALAȚI, STR.DOMNEASCĂ NR.47,
GALAȚI, GL, RO

(72) Inventatori:
• **BAHRIM GABRIELA ELENA,**
STR. PORTULUI NR.45, BL.MUREȘ, SC.2,
ET.3, AP.33, GALAȚI, GL, RO;

• **VASILE AIDA MIHAELA, STR. PORTULUI**
NR.49, BL.OLT1, ET.2, AP.9, GALAȚI, GL,
RO;

• **COTĂRLEȚ MIHAELA,**
STR.FURNALIȘTILOR, NR.2, BLE1, SC.4,
ET.3, AP.148, GALAȚI, GL, RO

(54) **CULTURĂ STARTER ARTIZANALĂ, PRODUS LIOFILIZAT
DIN GRANULELE DE CHEFIR DE LAPTE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei culturi starter artizanală cu aplicații biotehnologice. Procedeu, conform invenției, constă în liofilizare, la temperatura de -42°C a microorganismelor lider din consorțiul microbian de bacterii și drojdii din microbiomul natural al granulelor artizanale de chefir de lapte imobilizate pe o matrice naturală de chefiran și moja-

rarea granulelor de chefir de lapte, rezultând o pulbere liofilizată fină de cultură starter care păstrează proprietățile fermentative, timp de minimum 3 luni, în condiții de refrigerare.

Revendicări: 1

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).



Cultură starter artizanală, produs liofilizat din granulele de chefir de lapte

Rezumat:

Invenția se referă la descrierea procedului de conservare prin liofilizare, la temperatura de -42°C , a microorganismelor lider care alcătuiesc consorțiul microbial (bacterii și drojdii) din microbiomul natural al granulelor artizanale de chefir de lapte, cunoscute fiind proprietățile funcționale și valoarea terapeutică a produselor fermentate cu aceste culturi multiple, care funcționează optim în condiții naturale prin asociere în chefiran, exopolizaharide sintetizate de unele microorganisme din consorțiu, care asigură totodată imobilizarea naturală a celulelor și protecția acestora. Se obține astfel o cultură starter artizanală, sub formă de pulbere liofilizată, care conține multiple tulpini de microorganisme (bacterii și drojdii), fiind considerate tulpinile lider ale consorțiului natural, artizanal, care rezistă tratamentului de conservare prin liofilizare (congelare și uscare) și care își păstrează capacitatea fermentativă, timp de minim 3 luni, în condiții de refrigerare (la temperaturi de $0-4^{\circ}\text{C}$). Cultura starter artizanală, liofilizată, prezintă proprietăți fermentative similare cu cele ale granulelor în stare proaspătă, însă cantitatea utilizată cu rol de inocul se reduce semnificativ, iar condițiile de păstrare sunt mai facile și ușor de realizat, în condiții de eficiență economică.

Revendicări: 1

Figuri: 7

Scheme: 2

Descrierea invenției

Invenția se referă la descrierea unui procedeu de obținere prin liofilizare (-42°C) a unei culturi starter multiplă de microorganisme (bacterii și drojdii), derivate din microbiota granulelor artizanale de chefir de lapte, cu aplicații biotehnologice pentru utilizare în fermentarea laptelui și a produselor derivate (colostru, zer etc), pentru obținerea de alimente fermentate și nutraceutice funcționale, în două variante tehnologice de liofilizare, cu și fără adaos de agent crioprotector. Pentru a demonstra funcționalitatea culturilor liofilizate, au fost realizate probe de fermentare a laptelui, pentru care s-a urmărit evoluția parametrilor fermentativi (pH, aciditate) și stabilitatea potențialului fermentativ al culturilor liofilizate, după trei luni, prin păstrare la temperaturi de $0-4^{\circ}\text{C}$, în recipiente ermetic închise.

Scopul prezentei invenții este acela de a obține o cultură starter multiplă de bacterii și drojdii, pentru scopuri comerciale, utilizând microorganisme din culturi naturale, artizanale, care au proprietăți biochimice și funcționale deosebite, dar care nu pot fi izolate în culturi singulare și care cresc greu sau nu se dezvoltă în condiții controlate. Granulele de chefir de lapte asociază consorții de microorganisme (bacterii și drojdii) care funcționează pe principii de simbioză și sinergism, fiind imobilizate pe o matrice naturală denumită chefiran, un exopolizaharid sintetizat de același consorțiu (Van Wyk, 2019). Chefirul tradițional este un

produs lactat fermentat, obținut prin activitatea fermentativă a granulelor de chefir de lapte, sub formă de culturi artisanale, cu caracteristici senzoriale particulare și proprietăți funcționale deosebite, grație produselor rezultate prin activitatea metabolică a microorganismelor din consorțiu, format în principal din bacterii lactice, bacterii acetice și drojdii, care produc compuși cu efect postbiotic (acizi organici, vitamine, peptide bioactive, compuși cu acțiune antimicrobiană etc.).

În prezent, ca urmare a creșterii consumului de chefir la nivel mondial, în condiții industriale, chefirul se obține utilizând culturi starter comerciale, formate din tulpini specializate, de obicei modificate genetic, care însă nu pot îndeplini toate funcțiile metabolice și funcționale ale culturilor artisanale. Astfel, produsul finit se diferențiază net de cel obținut în condiții tradiționale, prin caracteristicile senzoriale (profilul de aromă, vâscozitatea și cremozitatea indusă de biosinteza de exopolizaharide etc.), dar și funcționale, deoarece culturile comerciale conțin un număr limitat de specii, în timp ce culturile artisanale conțin un număr substanțial mai mare. Grație proprietăților sale nutritive și funcționale, consumul de chefir aduce beneficii majore asupra sănătății consumatorului prin acțiunea antitumorală, efectele antialergice și activitatea terapeutică împotriva cancerului de colon, a aterosclerozei, efectele asupra patogenilor etc. (Witthuhn și colab., 2005b; Wyk, 2019).

Propunem astfel, dezvoltarea unui procedeu de conservare prin liofilizare a granulelor artisanale de chefir de lapte, în două variante experimentale, care să contribuie pe termen lung la posibilitatea obținerii de culturi starter comerciale, beneficiind de aportul culturilor naturale, care funcționează numai în consorțiu, pe principii de simbioză și sinergism. Astfel, este posibil să se obțină produse fermentate cu caracteristicile și proprietățile produselor tradiționale, în condiții de eficiență tehnologică și economică, în acord cu promovarea unei culturi nutriționale, prin diversificarea alimentației și a unui stil de viață sănătos, prin dezvoltarea și promovarea consumului de alimente funcționale, ținând cont de preferințele consumatorilor și stilul actual mult mai dinamic de viață, economisirea de timp, păstrând ceea ce de-a lungul timpului natura a creat și perfecționat.

Literatura de specialitate prezintă încercări de a conserva microorganismele derivate din microbiota granulelor de chefir de lapte, descrise pe scurt în cele ce urmează. Garrote și colab. (1997) au studiat conservarea granulelor de chefir de lapte la temperaturi scăzute, de -20°C și de -80°C și, respectiv, 4°C . Granulele păstrate în condiții de congelare, la temperaturi de -20°C și -80°C , timp de 120 zile și-au menținut potențialul fermentativ, atât din punct de vedere al dinamicii de fermentare, cât și ale proprietăților organoleptice și fizico-chimice ale produsului fermentat. Witthuhn și colab. (2005a) au evaluat impactul a patru tehnici de conservare, refrigerare, congelare, uscare și liofilizare, asupra activității fermentative a granulelor de chefir de lapte. Aceasta a fost evaluată la intervale de timp diferite, inițial și după 1, 3 și 10 luni, analizând în produsul fermentat pH-ul, aciditatea titrabilă, conținutul de lactoză și conținutul de acid lactic. S-a demonstrat că granulele de chefir păstrate la temperatura de -20°C și-au menținut activitatea fermentativă, timp de 7-8 luni de conservare, iar granulele de

chefir păstrate la temperaturi de refrigerare (0-4°C), au prezentat o diminuare drastică a activității metabolice, după aproximativ 10 zile.

Dacă se au în vedere limitările conservării prin congelare, precum: necesitatea asigurării lanțului frigorific, riscul de contaminare, distrugerea celulelor prin efectul cristalelor de gheață, corelate cu eficiența economică și unele limitări ale obținerii și utilizării inoculului, se poate concluziona că păstrarea granulelor în condiții de congelare nu este cea mai eficientă metodă din punct de vedere tehnologic. Aceasta metodă se pretează însă pentru păstrarea culturilor stoc în gestiunea colecțiilor de microorganisme.

Sarkar (2008) a studiat posibilitatea conservării granulelor de chefir prin uscare la temperatura camerei, în exicator, timp de 3 săptămâni. Rezultatele obținute au dovedit că acest procedeu nu este eficient, aspectul și caracteristicile senzoriale ale granulelor fiind drastic afectate, probabil ca urmare a procesului de autoliză a celulelor asociate cu matricea polimerică a granulei.

Uscarea prin pulverizare a fost testată pentru conservarea chefirului proaspăt, în vederea utilizării acestuia ca inocul pentru alte fermentații. Uscarea s-a realizat fără și cu adaos de agenți de protecție, după cum urmează: lapte degresat 20% (g/v); lapte degresat 20% (g/v) + maltodextrină 20% (g/v); permeat de zer 20% (g/v); permeat de zer 20% (g/v) + maltodextrină 20% (g/v). S-a demonstrat că în prezența acestor adaosuri, viabilitatea microorganismelor în pulberea obținută a fost substanțial îmbunătățită. Cele mai bune rezultate privind menținerea viabilității bacteriilor lactice și a drojdiilor în timpul uscării, a fost obținută prin adaos de permeat de zer, însă în prezență de lapte degresat și maltodextrină, s-a obținut cea mai mare stabilitate a numărului de celule viabile, după 60 de zile de păstrare, la temperatura de 4°C (Teijeiro și colab., 2018).

Kök Taş (2014) a studiat posibilitatea utilizării operației de liofilizare în scopul conservării viabilității și a potențialului fermentativ al consorțiului complex de microorganisme din granulele de chefir de lapte. Aceasta s-a realizat prin congelarea granulelor de chefir la temperatura de -20°C, care apoi au fost liofilizate la temperatura de -55°C, sub presiune de 1 Pa. Ulterior, granulele de chefir liofilizate au fost păstrate într-un ambalaj din plastic multistrat (tip ambalaj PET/Al/PP, producător Fleksipak Co., Turcia), ca barieră de protecție contra absorbției apei, timp de 90 de zile la temperaturi de păstrare diferite, de 24°C, 4°C și -20°C. Funcționalitatea culturii s-a demonstrat până în a 60-a zi de păstrare, la temperatura de 4°C.

Conde-Islas și colab. (2019) au demonstrat menținerea viabilității microorganismelor din granulele de chefir de lapte, conservate prin liofilizare, la valori de 8,5 log ufc/g, pentru bacterii lactice și peste 8,6 log ufc/g, pentru drojdii, într-un produs liofilizat cu indice de activitate al apei sub valoarea 0,2 și umiditate mai redusă de 6%.

În literatura de specialitate au fost identificate și o serie de brevete de invenție care se referă la conservarea prin liofilizare a produselor fermentate cu granule de chefir de lapte, dar nu și a granulelor ca atare, în vederea utilizării pulberii liofilizate în calitate de inocul pentru obținerea altor produse fermentate, iaurt, chefir, brânzeturi, după cum urmează:

Patent CN104186681A, *Preparation method of Tibetan kefir semi-hard cheese*, publicat în anul 2014, China, inventator Li Yunfei Mei Jun, prezintă o metodă de preparare a brânzei semi-tari utilizând microorganisme asociate cu microbiota granulelor de chefir de lapte, cu origine din Tibet. Inoculul de microorganisme în acest caz reprezintă o cultură obținută prin liofilizarea produsului fermentat, obținut prin liofilizarea laptelui fermentat cu granule de chefir, rezultând o pulbere conținând microorganisme viabile, apte pentru a iniția noi fermentații. Brânza obținută folosind cultura liofilizată obținută prin procedeul descris în brevet a prezentat caracteristici organoleptice specifice brânzei tradiționale chinezești.

Patent US4797290A, *Lyophilized process for the production of a kefir yoghurt*, publicat în anul 1989, USA, inventatori Sennosuke Tokumaru, Michinori Kubo, Mari Nogami, prezintă condițiile de obținere a pudrei de iaurt, prin fermentarea laptelui cu granule de chefir, în condiții biotehnologice specifice pentru obținerea iaurtului. Produsul fermentat a fost supus liofilizării și se recomandă să fie utilizat ca inocul pentru a iniția alte fermentații.

Patent CN102524387A, *Solid Kefir dairy product and preparation method thereof*, publicat în anul 2011, China, inventatori Wei Lihua, Zhu Hong Wang, Shijie Kang Zhiyuan, Lu Wei Wang, Hua Li Lihua, prezintă un procedeu de obținere a unui produs fermentat, utilizând ca inocul pudră de chefir, obținută prin liofilizarea produsului fermentat obținut prin fermentare laptelui cu granule de chefir de lapte, artisanale.

Față de invențiile brevetate mai sus, invenția propusă se individualizează prin elemente de certe de inovare deoarece se propune liofilizarea granulelor de chefir de lapte, în două variante de procesare, fără sau cu adaos de agent crioprotector, în vederea obținerii unei culturi starter artisanale de chefir, sub formă de pulbere, cu potențial de a iniția noi procese fermentative, în concentrații reduse. Cultura artizanală obținută păstrează în consorțiu natural microorganismele din microbiota naturală a granulelor de chefir de lapte, asociate în matricea polimerică nativă, care asigură imobilizarea naturală a celulelor și oferă protecția acestora pe perioada procesării prin liofilizare (congelare, uscare) și a conservării culturii. Capacitatea fermentativă a culturii starter obținută prin liofilizare se conservă după 3 luni de păstrare a culturii în condiții sterile, la temperaturi de 0-4°C, în absența luminii, în recipiente ermetice închise.

Parametrii invenției

1. Proveniența, conservarea și gestiunea granulelor artisanale de chefir de lapte

Granulele de chefir de lapte utilizate în experimentele descrise în această cerere provin dintr-o cultură artizanală, care s-a perpetuat în timp prin multiplicare în lapte, în condiții casnice. Un eșantion a fost preluat și este păstrat sub formă de cultură stoc, prin conservare în glicerol (soluție de 40%) și congelare la temperatura -80°C , **în gestiunea Colecției de microorganisme cu indicativul MIUG**, din cadrul Platformei de cercetare și formare Bioaliment, din cadrul *Centrului de cercetare, expertiză și transfer tehnologic în industria alimentară (Bioaliment-TehnIA)*, din cadrul facultății Știința și Ingineria Alimentelor, din cadrul Universității „Dunărea de Jos” din Galați. Toate manipulările și cultivările ulterioare ale granulelor păstrate în colecția MIUG s-au realizat în condiții aseptice, iar cultivările au fost realizate în medii sterile.

2. Multiplicarea granulelor de chefir de lapte

Multiplicarea granulelor de chefir s-a realizat prin cultivarea în cicluri succesive, în lapte UHT cu 3,5% grăsime, timp de 24 de ore, la temperatura de 30°C , pornind de un inocul constituit din granulă reactivată, în concentrație de 1%. Un număr de **45 de cicluri de cultivare** au fost realizate. La inițierea fiecărui ciclu, biomasa granulelor s-a separat din mediul fermentat anterior, s-a spălat cu apă ultrapură până la îndepărtarea totală a resturilor de coagul și apoi a fost utilizată ca inocul pentru un nou ciclu de cultivare. După aceste cicluri de cultivare, biomasa umedă a granulelor s-a multiplicat de 4 ori, comparativ cu masa inițială.

3. Analiza granulelor de chefir prin microscopie electronică de baleiaj (SEM)

Pentru analiza SEM, granulele de chefir au fost supuse unui tratament fizic de deshidratare (Guzel-Seydim și colab., 2005). Astfel, granulele de chefir au fost secționare, iar probe au fost prelevate de la suprafața granulei dar și din centrul granulei. Apoi, granulele au fost fixate în glutaraldehidă 25% în apă, timp de 4 h, la temperatura de 25°C . Pregătirea probelor înaintea analizei SEM a presupus fixarea probei pe un suport metalic, folosind bandă de carbon cu față dublu adezivă pentru a asigura o conductivitate electrică a probei în urma interacțiunii cu fasciculul de electroni incident. Procedul de metalizare a constat în acoperirea cu un strat foarte subțire de aliaj de aur (cu grosimea de câțiva nm), în vid (presiune 400 militorr), în mediu controlat cu ioni de argon prin procesul fizic de pulverizare (sputter coater). Echipamentul folosit a fost SPI-Module Quartz Crystal Thickness Monitor, SPI Supplies (USA). Analiza morfologică SEM s-a efectuat în modul de vid ESEM, la o presiune de 60 Pa, o tensiune de accelerare a electronilor de 15 kV, spotul fasciculului de electroni de 4.0. S-au ales mărimi diferite: 1000x, 2500x și 5000x, utilizând echipamentul Microscop Electronic de tip Quanta 200 FEI, atât la suprafața cât și în secțiunea granulei.

4. Liofilizarea biomasei granulelor de chefir de lapte

Conservarea granulelor de chefir de lapte s-a realizat prin liofilizare (liofilizator tip CHRIST Alpha 1-4 LD plus, Germania), la temperatura de - 42°C, sub presiune de 0,10 mBar, timp de 72 ore, în două variante:

V1. Granulele ca atare, fără nici un agent crioprotector – O cantitate de **76 g** biomasă de granule proaspete s-a suspus liofilizării, fără nici un alt adaos crioprotector și după tratament s-au obținut **9,96 g** granule liofilizate, care și-au menținut forma inițială, dar și-au redus dimensiunile, iar culoarea s-a transformat din alb în alb-crem (**Schema 1**).

V2. Granule imersate în lapte UHT degresat 0,1% grăsime (g/v), cu rol de crioprotecție - O cantitate de **45 g** granule s-au imersat în **55 mL** lapte degresat și apoi amestecul a fost suspus liofilizării, iar în final s-au obținut **10,82 g** granule liofilizate, prezentând caracteristici similare cu cele prezentate în varianta anterioară, cu mențiunea ca s-a intensificat culoarea crem a granulelor liofilizate, până la tentă galbuie (**Schema 2**).

Produsele obținute sunt denumite în continuare **cultură starter artizanală, liofilizată (V1 și V2)**.

5. Testarea funcționalității și stabilității culturii starter artizanală, liofilizată

Funcționalitatea culturilor starter artizanale, liofilizate, a fost studiată **imediat după liofilizare** și după **trei luni de păstrare, la temperaturi de 0-4°C**. Astfel, s-a analizat capacitatea de a produce fermentația laptelui ca substrat, parametrii analizați fiind pH-ul și aciditatea produsului fermentat. Capacitatea fermentativă a fost comparată cu cea a unei granule proaspete. pH-ul probelor s-a determinat cu ajutorul pH-metrului Mettler Toledo (Germania). Aciditatea s-a determinat prin titrare cu soluție 0,1N NaOH, în prezența indicatorului fenolftaleină. Astfel, 4 g de probă fermentată s-au prelevat într-un balon cotelat de 50 mL. S-a completat volumul până la semn cu apă distilată. După omogenizare, s-au prelevat 10 mL și apoi s-au titrat cu soluție 0,1N NaOH, în prezența fenolftaleinei, până la virajul culorii în slab roz, persistentă un minut. Aciditatea s-a determinat folosind formula:

$$\text{Aciditatea, } ^\circ\text{Th} = V_{\text{NaOH } 0,1\text{N}} \times 125,$$

unde, $V_{\text{NaOH } 0,1\text{N}}$ – reprezintă volumul de NaOH 0,1N folosit la tirarea probei;
125 – coeficient de diluție.

Toate experimentele au fost realizate în triplicat.

Procesele biotehnologice (cultivare, fermentații) și analizele au fost realizate în cadrul *Centrului Integrat de Cercetare, Expertiză și Transfer Tehnologic pentru Industria Alimentară* de la Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați (<https://erris.gov.ro/FOOD-BIOTECHNOLOGY>; <http://www.unicer.ugal.ro/index.php/ro/prezentare-tehnia>).

Experimente efectuate

Imagini prezentând aspectul granulelor de chefir de lapte multiplicare (**Figura 1**) și imagini obținute prin microscopia electronică de baleiaj (SEM) (**Figura 2**) sunt prezentate în cele ce urmează.



Fig.1. Granule artisanale de chefir de lapte, cultivate în lapte

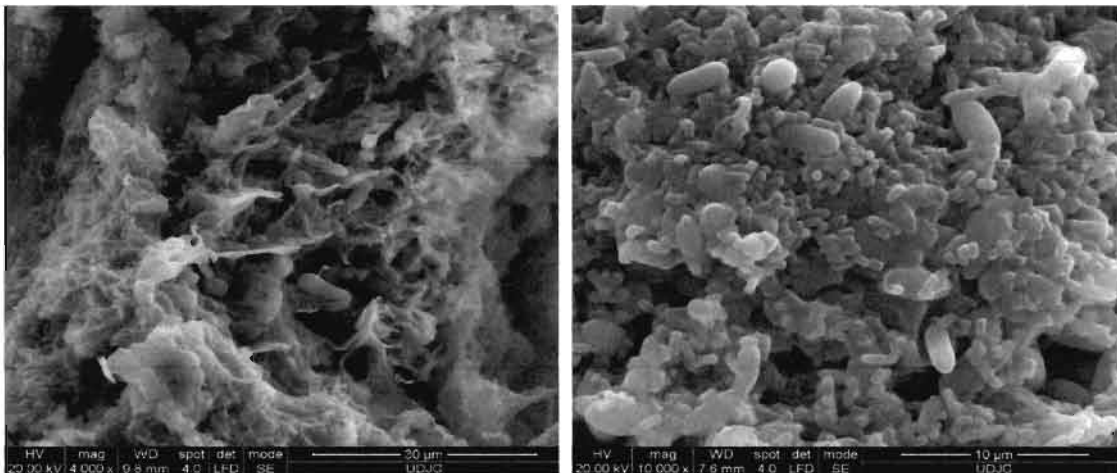


Fig. 2. Imagini SEM ale granulei de chefir lapte, în secțiunea granulei (stânga); la suprafața granulei (dreapta)

După cum se poate observa în **Figura 2**, granula reprezintă un multiconsorțiu natural de bacterii și drojdii, asociate în suportul exopolizaharidic, densitatea celulelor fiind superioară în interiorul granulei.

După liofilizare, granulele de chefir au fost mărunțite prin mojarare, pulberea s-a omogenizat și s-a ambalat în sticle sterile cu protecție UV, ermetic închise, păstrate la temperatura de 0-4°C până la caracterizare și utilizare.

Aspectul granulelor liofilizate și a pulberii obținută după mojarare se prezintă în **Figura 3** (cultură starter artizanală, liofilizată, obținută conform V1) și în **Figura 4** (cultură starter artizanală, liofilizată, obținută conform V2).



Fig.3. Aspectul culturii starter artizanală, liofilizată, obținută în varianta V1: a) după liofilizare (stânga); b) după omogenizare (dreapta)

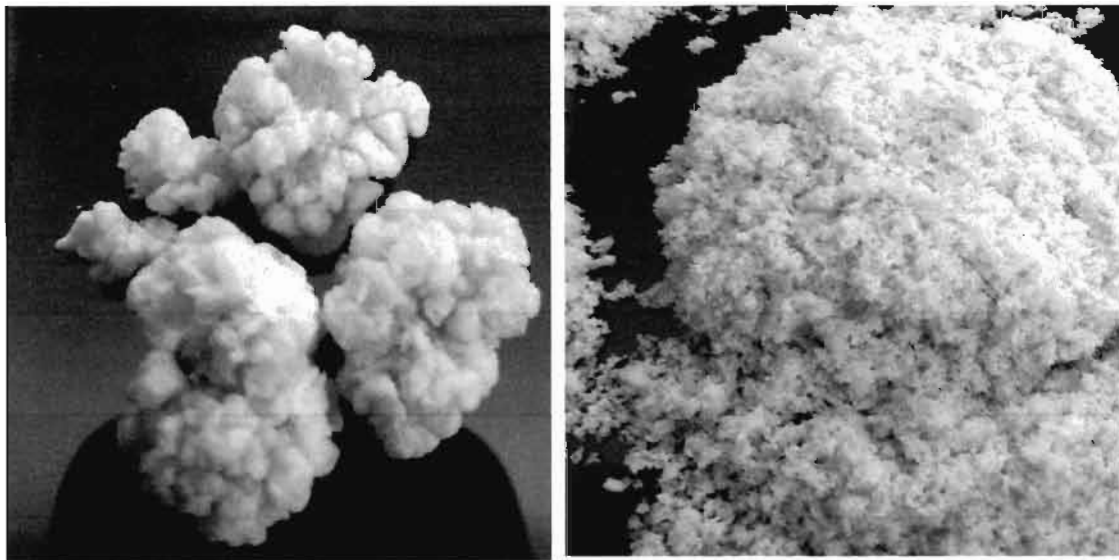


Fig.4. Aspectul culturii starter artizanală, liofilizată, obținută în varianta V2: a) după liofilizare (stânga); b) după omogenizare (dreapta)

Imagini SEM ale culturii starter artisanale, liofilizată, sunt prezentate în **Figura 5**.

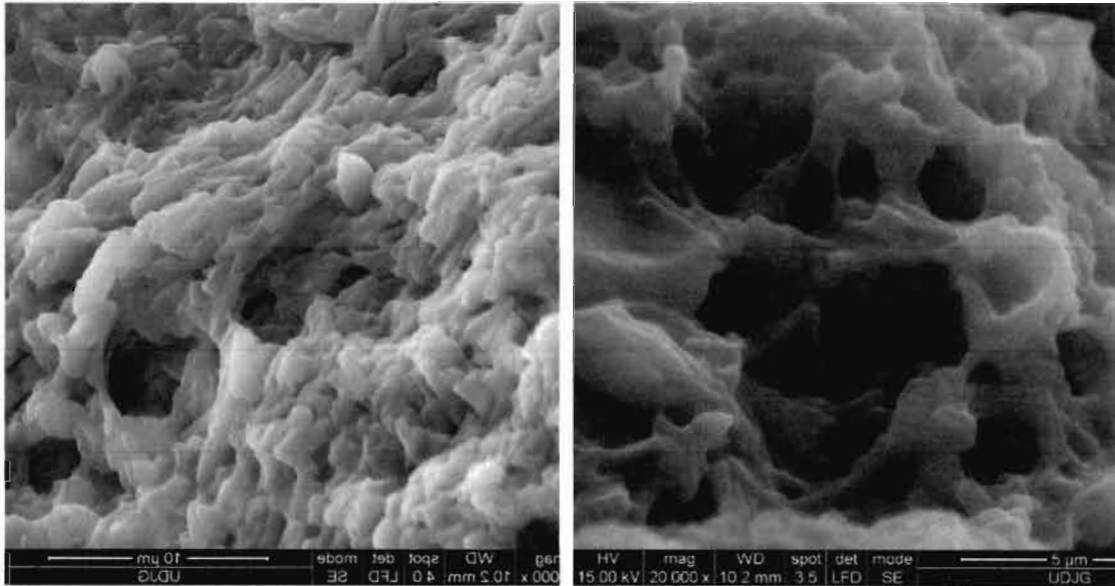


Fig. 5. Imagini SEM ale culturii starter artisanală, liofilizată, prin procedeele V1 (stânga) și V2 (dreapta)

După cum se poate observa din **Figura 5**, exopolizaharidul acoperă celulele, care sunt mai dense în cultura starter artisanală, liofilizată prin procedeul V1 (liofilizare, fără adaos de agent crioprotector). Corelând aceste imagini cu cele din **Figura 4b**, se observă aspectul mai expandat al pulberii și a matricii polimerice, în cazul culturii obținute prin procedeul V2 (liofilizare în prezență de 55% lapte UHT cu 0,1% grăsime).

1. Evaluarea potențialului fermentativ al culturii starter artisanală, liofilizată (V1, V2)

Funcționalitatea metabolică a culturii starter artisanală, liofilizată, obținută prin ambele procedee de liofilizare (V1 și V2), s-a testat prin comparație cu o granulă de chefir în stare activă (proba martor), imediat după liofilizare și după 3 luni de conservare la temperaturi de 0-4°C, prin fermentarea laptelui UHT cu 3,5% grăsime, timp de 72 ore, la temperatura de 30°C.

Au fost utilizate **2 concentrații de cultură starter artisanală, liofilizată (V1 și V2)**, rezultând 4 variante de probe fermentate, comparate cu proba martor, după cum urmează:

Martor – un volum de 100 mL lapte UHT cu 3,5% grăsime a fost inoculat cu 2g granulă de chefir, activă.

P1, P1' – două probe, în care un volum de 100 mL lapte UHT cu 3,5% grăsime a fost inoculat cu 0,125 g din culturile starter liofilizate, obținute în variantele V1 (P1) și V2 (P1').

P2, 2' – două probe, în care un volum de 100 mL lapte UHT cu 3,5% grăsime a fost inoculat cu 0,250 g din culturile starter liofilizate, obținute în variantele variantele V1 (P2) și V2 (P2').

Culturile liofilizate s-au adăugat direct în lapte, fără hidratare (reactivare) realabilă.

1.1. Potențialului fermentativ al culturii după liofilizare

Rezultatele sunt prezentate în **Tabelul 1**.

Tabel 1. Parametrii de fermentare ai laptelui cu cultură starter liofilizată (72 ore, la temperatura de 30°C)

Probe	Cultură liofilizată, varianta V1		Cultură liofilizată, varianta V2	
	pH	Aciditate titrabilă, °Thorner	pH	Aciditate titrabilă, °Thorner
Martor	4,08 ± 0,11	150,00 ± 8,55	4,08 ± 0,11	150,00 ± 8,55
P1, P1'	4,00 ± 0,10	156,25 ± 3,55	5,09 ± 0,12	100,00 ± 0,25
P2, P2'	4,07 ± 0,15	150,00 ± 0,50	5,00 ± 0,23	97,00 ± 0,36

Se poate observa din **Tabelul 1**, că liofilizarea granulelor fără adaos de agent crioprotector conduce la obținerea unei culturi starter cu o capacitate fermentativă similară cu cea a granulei proaspete, ambele concentrații de inocul, 0,125% și 0,250% pulbere liofilizată induc procese fermentative similare cu un inocul format din 2% granulă proaspătă. O imagine SEM realizată din produsul fermentat se prezintă în **Figura 6**.

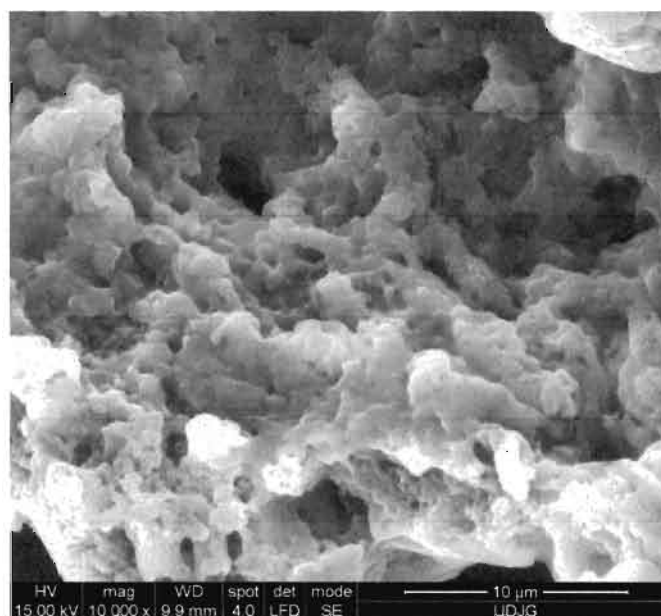


Fig. 6. Imagine SEM din produsul fermentat obținut prin fermentarea laptelui UHT cu 3,5% grăsime, cu 0,125% cultură starter artizanală, liofilizată, obținută prin procedeul de liofilizare V1

După cum se observă în **Figura 6**, puține celule se regăsesc în mediul fermentat, acestea rămân asociate de matricea polimerică naturală, chiar dacă aceasta s-a mărunțit prin mojarare.

O concentrația 0,125% de cultură liofilizată se consideră eficientă și din punct de vedere tehnologic și se recomandă a fi utilizată ca inocul pentru inițierea eficientă a proceselor de fermentație a laptelui și a unor produse derivate (colostru, zer etc).

1.2. Potențialului fermentativ al culturii liofilizate, după 3 luni de conservare în condiții de refrigerare

Pentru concentrația de 0,125% cultură starter, obținută în variantele de liofilizare V1 și V2, s-a testat potențialul fermentativ și după 3 luni de păstrare la temperaturi de 0-4°C (probele P3 și P3'). Ca probă martor s-a utilizat și în acest caz o probă obținută în condiții similare, în care drept inocul s-au utilizat 2% granule proaspete de chefir. Rezultatele sunt prezentate în **Tabelul 2**.

Tabel 2. Parametrii de fermentare a laptelui (72 ore, la temperatura de 30°C) cu cultură starter artizanală, liofilizată, după 3 luni de păstrare, la temperatura de 0-4°C

Probe	Cultură liofilizată, varianta V1		Cultură liofilizată, varianta V2	
	pH	Aciditate titrabilă, °Thorner	pH	Aciditate titrabilă, °Thorner
Martor	4,05 ± 0,13	150,00 ± 0,55	4,05 ± 0,13	150,00 ± 0,55
P3, P3'	4,08 ± 0,12	147,92 ± 9,54	5,22 ± 0,18	87,50 ± 6,25

Rezultatele obținute (**Tabelul 2**) certifică faptul că pulberea derivată din granule de chefir, liofilizate fără agent crioprotector își menține potențialul fermentativ, după 3 luni de păstrare la temperaturi de 0-4°C, având activitatea fermentativă superioară (P3), comparativ cu cea obținută din granule liofilizate amestecate de lapte degresat (P3'), comparabilă cu activitatea granulelor de chefir în stare proaspătă (proba martor).

Exopolimerul natural sintetizat de însuși microorganismele din consorțiu are un rol esențial în protecția celulelor și reprezintă o matrice eficientă pentru imobilizarea nativă a celulelor.

La utilizarea culturii starter artizanală, liofilizată, după 72 ore de cultivare în lapte, la temperatura de 30°C, s-a observat tendința de refacere a granulelor și a consorțiului natural, din laptele fermentat, putându-se separa mici structuri polimerice, care au fost analizate prin microscopie SEM și în care se pot observa asociații de celule (**Figura 7**).

În baza rezultatelor prezentate se propune conservarea granulelor de chefir de lapte prin liofilizare, fără adaos de agent crioprotector, la temperatura de -42°C, presiune de 0,10 mBar (**Schema 1**), timp de 72 ore.

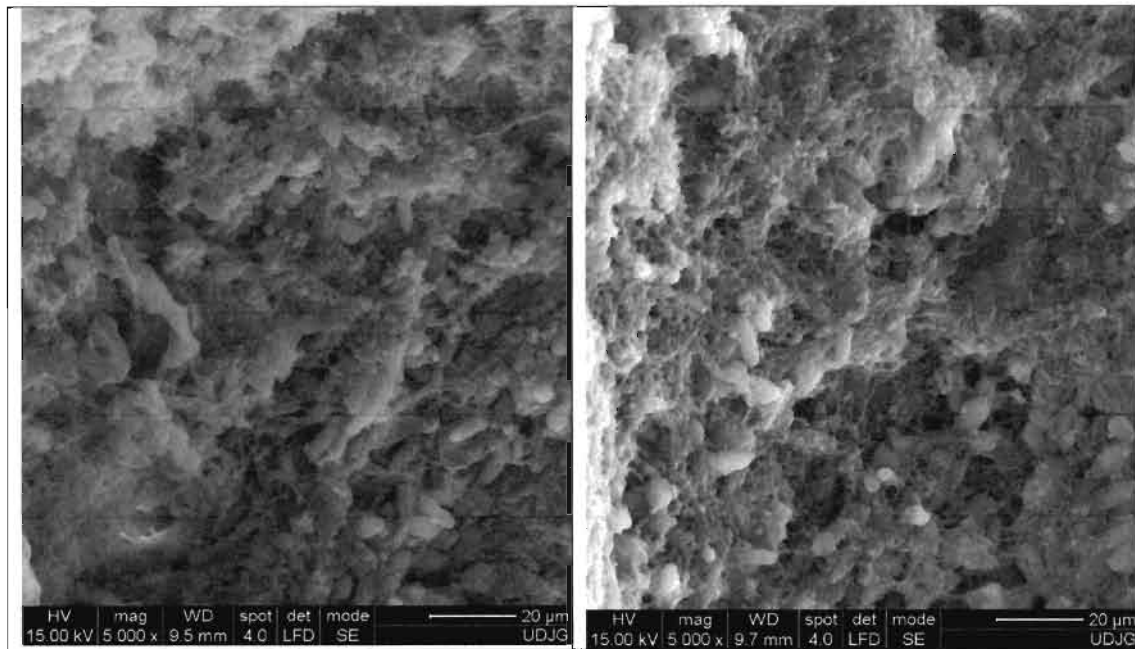


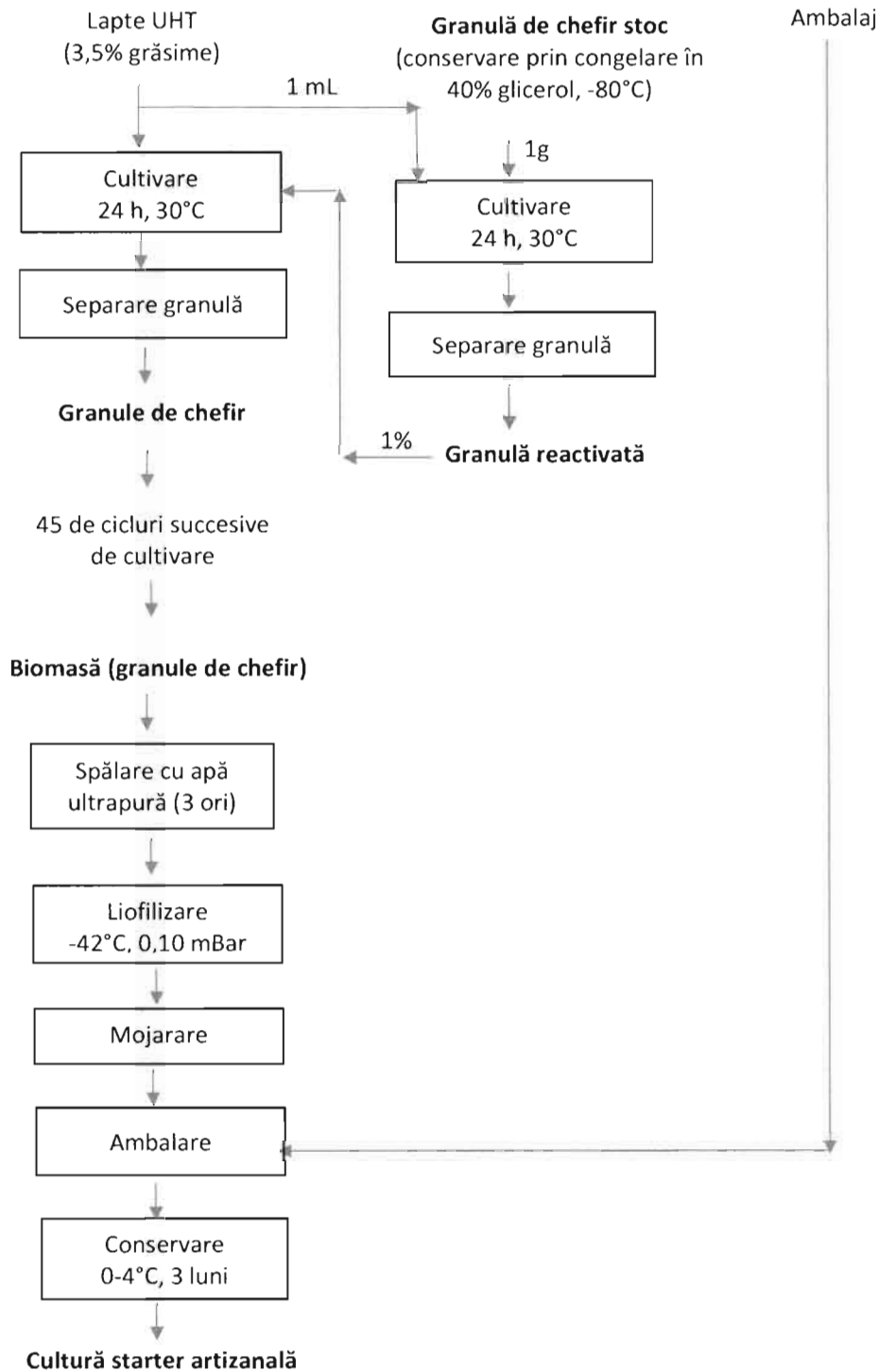
Fig. 7. Aglomerări de celule (bacterii și drojdii), în refacerea consorțiilor naturale după fermentarea laptelui UHT cu 3,5% grăsime, cu 0,125% cultură starter artizanală, liofilizată

Concluzii

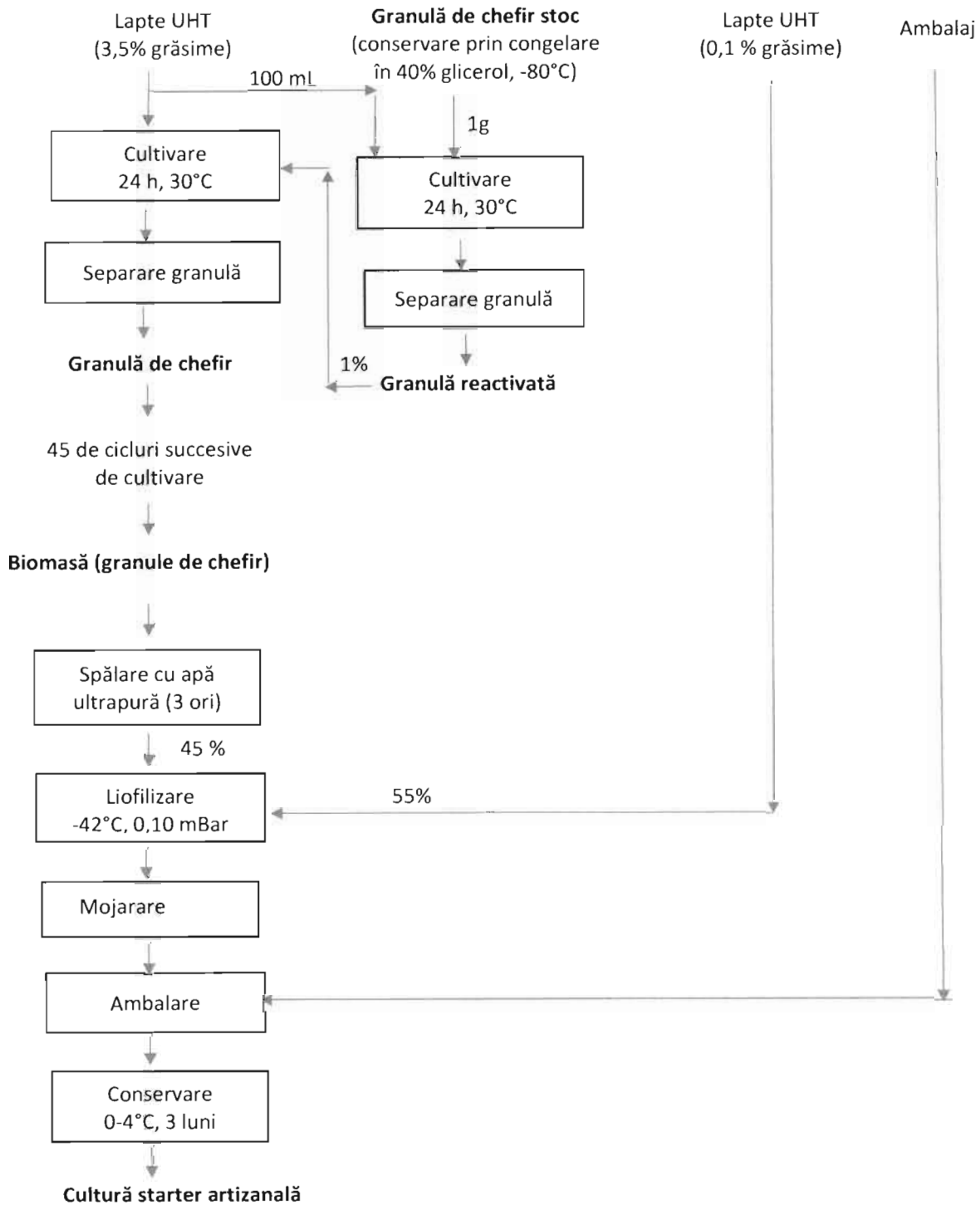
Rezultatele obținute în prezenta propunere de invenție susțin posibilitatea conservării granulelor de chefir de lapte prin liofilizare, în condiții simple, cultura starter artizanală, liofilizată obținută, prezentând activitatea fermentativă comparabilă cu a granulelor proaspete și stabilitate metabolică nealterată prin conservare timp de minim 3 luni, la temperaturi de 0-4°C.

Cultura starter artizanală, liofilizată este eficientă în concentrație redusă (0,125%), comparabilă cu a culturilor starter comerciale.

Procedeul de conservare propus, liofilizarea granulelor de chefir de lapte, reprezintă o alternativă eficientă de a obține, în condiții biotehnologice simple, culturi starter naturale, simplificând substanțial condițiile de utilizare, atât în condiții casnice, dar și în condiții pilot sau industriale. Beneficiile culturii artizanale liofilizate derivă și din faptul că se conservă eficient și se valorifică potențialul fermentativ al consoțiilor naturale de microorganisme, care din cele mai vechi timpuri s-au adaptat și acționează în simbioză și sinergism, cu proprietăți probiotice și postbiotice deosebite, de protecție și cu rol funcțional. Totodată, produsele fermentate obținute cu aceste culturi au prezentat caracteristici senzoriale similare cu cele ale produselor tradiționale, preferate de consumatori, în contrast cu produsele obținute industrial folosind culturi starter comerciale, cu proprietăți biotehnologice limitate, care de obicei se utilizează în combinații multiple, dar care nu se ridică la valoarea tehnologică și funcțională a consoțiilor naturale.



Schema 1. Schema bloc pe operații unitare de obținere a culturii starter artizanală, liofilizată, derivată din granule de chefir de lapte, prin procedeul de liofilizare VI



Schema 2. Schema bloc pe operații unitare de obținere a culturii starter artizanală, liofilizată, derivată din granule de chefir de lapte, prin procedeul de liofilizare V2

Referințe bibliografice

- Conde-Islas, A. Á., Jiménez-Fernández Cantú-Lozano, M. D., Urrea-García, G. R., Luna-Solano, G., 2019, *Effect of the Freeze-Drying Process on the Physicochemical and Microbiological Properties of Mexican Kefir Grains*, Processes 7(3):127-142.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. L., 1997, *Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study*, LWT - Food Science and Technology, 30 (1):77-84.
- Guzel-Seydim, Z., Wyffels, J. T., Seydim, A. C., Greene, A. K., 2005, *Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation*, International Journal of Dairy Technology, 58:25-29.
- Kök Taş, T., 2014, *Effect of storage parameters on freeze-dried kefir grains*, International Journal of Dairy Technology, 68(3):434-440.
- Sarkar, S. 2008, *Biotechnological innovations in kefir production: a review*. British Food Journal, 110(3):283-295.
- Teijeiro, M., Pérez, P. F., De Antonia, G. L., Golowczy, M. A., 2018, *Suitability of kefir powder production using spray drying*, Food Research International 112:169-174.
- Wyk, V., 2019, *Kefir: The Champagne of Fermented Beverages*, pp. 473-527. In: Grumezescu, A., Holban, A. M. (Eds), *Fermented Beverages*, 1st Edition, Volume 5, The Science of Beverages, eBook ISBN: 9780128157039
- Witthuhn, R. C., Cilliers, A., Britz, T. J., 2005a, *Evaluation of different preservation techniques on the storage potential of kefir grains*, Journal of Dairy Research, 72(1):125-128.
- Witthuhn, R. C., Schoeman, T., Cilliers, A., Britz, T. J., 2005b, *Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains*. Food Microbiology, 22(4):337-344.

Revendicări

Cultură starter artizanală, produs liofilizat din granulelor de chefir de lapte, cultură starter artizanală, multiplă, conținând bacterii și drojdii active, obținută prin liofilizarea și mojararea granulelor de chefir de lapte, care se prezintă sunt formă de pudră fină, de culoare crem-gălbui și se păstrează în ambalaje ermetic închise, la temperaturi de 0-4°C, pentru o perioadă de cel puțin 3 luni.