

Proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2013

Axa prioritară: nr. 1: “Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere”

Domeniul major de intervenție 1.5.: “Programe doctorale și post-doctorale în sprijinul cercetării”

Titlul proiectului: Integrarea cercetării românești în contextual cercetării europene-burse doctorale. Cod Contract: POSDRU/88/1.5/S/60370



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU

TEZĂ DE DOCTORAT

CERCETĂRI PRIVIND IZOLAREA ȘI DEZVOLTAREA INDUSTRIALĂ A UNOR TULPINI PROBIOTICE DIN LAPTELE UMAN MATERN ȘI REALIZAREA UNOR PRODUSE NUTRACEUTICE DESTINATE ALIMENTAȚIEI SUGARILOR



Conducător științific

Prof univ dr.ing. Ovidiu Tița



Doctorand

Bogdan Neamțu

SIBIU, 2014

Cuprins

Capitolul 1	5
Introducere.....	5
Capitolul 2	6
Obiectivele cercetării.....	6
2.1 Obiectivul principal al studiului.....	6
2.2 Obiectivele secundare	6
2.2.1. Analiza laptelui recoltat de la mame care alăptează	6
2.2.2. Identificarea tulpinilor izolate din laptele matern	6
2.2.3. Creșterea în bioreactor a tulpinilor izolate din laptele matern	6
2.2.4. Evaluare rezistență tulpini in diferite medii de creștere.....	6
2.2.5. Microîncapsulare.....	6
Partea Documentară.....	7
Capitolul 3	7
Taxonomia probioticelor	7
3.1. Generalități.....	7
3.2 Istoric	7
3.3 Taxonomia microorganismelor probiotice	8
3.4 Genul Lactobacillus	8
3.5 Genul Bifidobacterium.....	8
Capitolul 4	9
Probioticele și sănătatea.....	9
4.1 Introducere	9
4.2 Efectele probioticelor în enterocolite.....	9
4.3 Efectele probioticelor în infecția cu Helicobacter pylori	9
4.4 Efectele probioticelor în infecțiile respiratorii	10
4.5 Efectele probioticelor în cancer	10
4.6 Efectele probioticelor în alergii.....	10
4.7 Efectele probioticelor asupra sistemului imun.....	10
4.8 Efectele probioticelor în infecțiile urinare	10
Capitolul 5	12
Metode de izolare și cultivare a tulpinilor de probiotice	12
5.1 Introducere	12
5.2 Izolarea bacteriilor lactice	12
5.2.1. Izolare din iaurt și alte produse lactate.....	12
5.2.2 Izolarea bacteriilor lactice din laptele uman	12

5.3 Identificarea fenotipică	12
5.4 Evaluarea în vitro a tulpinilor bacteriene potențial probiotice.....	13
5.4.1 Rezistența la acid gastric	13
5.4.2. Rezistența la acizi biliari	13
5.4.3. Concentrația bacteriană.....	13
5.4.4 Timpul de incubație	13
5.5. Izolarea și selecția.	14
5.5.1 Întreținerea tulpinilor.	14
5.5.2 Materii prime utilizate pentru dezvoltare.....	14
5.6 Condiții de cultivare și obținere a probioticelor.....	14
5.6.1 Cultura de inocul.	14
5.6.2 Biosinteza la nivel micropilot.	14
Capitolul 6	15
Factori bioactivi din laptele matern	15
6.1 Introducere	15
6.2 Nefelometrie versus turbidimetrie	15
6.2.1 Metoda nefelometrică	15
6.2.2 Metoda turbidimetrică.....	16
6.2.3 Nefelometria utilizată în analiza laptelui	16
6.3 Factorii bioactivi din lapte	16
6.3.1 Proteinele	16
6.3.2 Carbohidrații	16
6.3.3 Lipidele și vitaminele.....	17
6.3.4 Nucleotidele, nucleozidele și acizii nucleici	17
Capitolul 7	18
Principii de încapsulare	18
7.1 Materiale de încapsulat	18
7.1.1 Alginatul.....	18
7.1.2 Chitosanul	18
7.1.3 Guma xanthanică.....	18
7.1.4 Guma gelanică:	18
7.1.5 Carrageenan:	18
7.1.6 Ftalat acetat celulozic (CAF)	19
7.1.7 Amidonul	19
7.1.8 Gelatina	19
7.1.9 Proteinele din lapte.....	19
7.1.10 Pectinele	19

7.2. Microîncapsularea	20
7.2.1. Introducere, definiții, generalități	20
7.2.2. Clasificare microcapsule	20
7.2.3 Membrana	20
7.2.4. Nucleul	20
7.2.5. Diametrul microcapsulelor și concentrațiile polimerilor folosiți	20
7.3. Metode de analiza a microcapsulelor	21
7.3.1. Determinarea formei și dimensiunii microcapsulelor	21
7.3.2. Determinarea concentrației microcapsulelor	21
7.4. Metode de încapsulare	21
7.4.1. Emulsificare și gelificare	21
7.4.2. Extruzia	22
7.4.3 Metoda de dispersie prin atomizare (spray-drying)	22
7.4.4. Spray freeze drying	22
7.4.5. Spray chilling	22
7.4.6. Spray coating	22
7.4.7. Coacervarea	22
Partea experimentală	24
Capitolul 8	24
Materiale și metode în cercetarea propusă	24
8.1. Recoltarea și analiza probelor de lapte	24
8.2. Identificarea bacteriană a tulpinilor de Lactobacillus spp.	24
8.3 Creșterea tulpinilor izolate din laptele matern în bioreactor	24
8.4 Evaluarea în vitro a tulpinilor bacteriene potențial probiotice	24
8.5 Microîncapsularea tulpinii de Lactobacillus Paracasei ssp paracasei(L ₁₈)	25
Capitolul 9	26
Evaluarea factorilor bioactivi imuni din laptele matern și laptele praf	26
9.1 Introducere	26
9.2 Obiective	26
9.3 Material și metodă	26
9.4. Rezultate	27
Capitolul 10	28
Identificarea bacteriană a tulpinilor de Lactobacillus ssp.	28
10.1 Introducere	28
10.2 Obiective:	28
10.3. Material și metoda :	28
10.3.1 Principiul metodei:	29
10.4. Rezultate	29

Capitolul 11	31
Creșterea tulpinilor izolate din laptele matern în bioreactor	31
11.1 Introducere	31
11.2 Obiective	31
11.3 Material și metoda.....	31
11.4. Rezultate	31
Capitolul 12	33
Evaluarea în vitro a tulpinilor bacteriene potențial probiotice	33
12.1 Introducere	33
12.2 Obiective	33
12.3 Material și metodă.....	33
12.4 Rezultate	33
Capitolul 13	35
Microîncapsularea tulpinii de <i>Lactobacillus Paracasei</i> ssp <i>Paracasei</i> (L _{18-p7})	35
13.1 Introducere	35
13.2 Obiective	35
13.3 Material și metodă.....	35
13.4 Rezultate	36
Capitolul 14	37
Concluzii.....	37
14.1 Concluzii generale	37
14.2 Recomandări	38
14.3 Contribuții proprii și tendințe viitoare de dezvoltare a cercetării	38
Bibliografie.....	40
Publicații:.....	50

Capitolul 1

Introducere

Probioticele sunt definite ca "microorganisme vii care în cantități adecvate aduc beneficii gazdei" (FAO/WHO, 2002) și sunt extrem de importante ca și alimente funcționale (reprezintă 65% din piața mondială a alimentelor) [4,27]. Probioticele sunt considerate suplimente alimentare cu rol benefic asupra sănătății. Efectele pozitive asupra sănătății se corelează specific cu tipul de tulpină [27, 36]. Probioticele sunt reprezentate de o gamă largă de microorganisme din domeniul bacteria, prokariote genul *Lactobacillus* (aproximativ 116 specii la nivelul anului 2008) și respectiv genul *Bifidobacterium* (aproximativ 30 de specii), dar și din domeniul fungi (anumite drojii)[27].

Cele mai importante beneficii ale probioticelor se referă la menținerea microflorei normale intestinale, apărare în infecțiile cu enteropatogeni, în infecțiile urinare sau infecțiile digestive cu *Helicobacter Pylori* (prin imunomodulare), în modularea răspunsurilor alergice (dermatită atopică, astmul bronșic, wheezing-ul recurent), activități anticarcinogenice și antimutagenice, în scăderea nivelului colesterolului[27,36].

Bacteriile probiotice sunt enumerate și izolate din iaurt și produse lactate probiotice disponibile în comerț. Materialul utilizat pentru izolare este laptele uman obținut de la mame voluntare sănătoase. Probele se recoltează în recoltoare sterile și sunt stocate în gheață până la livrarea la laborator. Odată livrate în laborator se inițiază procedura de izolare[121].

Izolarea și dezvoltarea industrială de probiotice din laptele uman matern reprezintă un subiect de mare actualitate și o adevărată provocare pentru centrele de microbiologie lactată și biotehnologii din întreaga lume (Malek et Al 2010). Rolurile laptelui matern (pe lângă necesitățile nutriționale și respectiv protecția antiinfecțioasă) sunt inițierea și dezvoltarea florei intestinale a sugarului imediat după naștere, în principal datorită microbiotei naturale din laptele matern (stafilococi, streptococi, micrococi, lactobacili și enterococi)[121].

Obținerea de culturi de probiotice din laptele uman matern prezintă ca avantaje următoarele: sunt de proveniență umană, sunt adaptate la substraturile nutriționale din produsele lactate și au un aport sigur la copii. Selectarea unor tulpini de probiotice, în vederea încapsulării lor și obținerea de produse nutraceutice, folosind drept sursă de izolare laptele de la mame care alăptează sugari cu infecții respiratorii poate fi un deziderat și o idee interesantă de cercetare. Metaanalize pe studii la care s-au evaluat ratele de spitalizare la sugarii cu infecții de căi respiratorii inferioare (sugari alimentați la sân versus sugari alimentați cu formule de lapte praf) au arătat fără echivoc o rată de spitalizare de 3 ori mai mare la cei alimentați cu formule de lapte praf față de cei alimentați natural[44,45].

Infrastructura de cercetare a Spitalului Clinic de Pediatrie Sibiu (compartimentul de bacteriologie cu posibilitatea de izolare, analiză microbiologică, chimică și metabolică a tulpinilor) infrastructura de cercetare a Facultății S.A.I.A.P.M, Universitatea Lucian Blaga Sibiu, compartimentul microbiologie și biotehnologii (posibilitatea de biosinteză la nivel micropilot), și nu în ultimul rând infrastructura de cercetare în domeniul tehnologiilor farmaceutice și biotehnologiilor din cadrul Facultății de Medicina V.Papilian din Sibiu, au făcut posibilă realizarea unei lucrări de cercetare de asemenea amploare.

Capitolul 2

Obiectivele cercetării

2.1 Obiectivul principal al studiului

Obiectivul principal al studiului a fost realizarea unor cercetări privind izolarea și dezvoltarea industrială a unor tulpini probiotice din laptele uman matern și obținerea unor produse nutraceutice destinate alimentației sugarilor.

2.2 Obiectivele secundare

În subsidiar am urmărit aspecte specifice legate de : 1.analiza probelor de lapte, 2. identificarea tipurilor de tulpini cu fenotipurile lor specifice, 3. particularitățile de creștere în bioreactor și testarea rezistenței tulpinilor în vitro, 4. diferențele între metodele de încapsulare din perspectiva parametrilor microcapsulelor obținute (diametru, grosimea peretelui).

2.2.1. Analiza laptelui recoltat de la mame care alăptează

1.Studiul protecției imune a sugarilor alimentați cu lapte matern comparativ cu cei alimentați cu formule de lapte praf ; 2. Identificarea factorilor bioactivi din laptele matern și formulele de lapte praf, factori implicați în protecția imună ; 3. Studiul impactului nivelului IgA din laptele matern și laptele praf asupra imunoglobulinelor (IgA și IgG) din serul sugarilor ; 4. Studiul impactului nivelului lactozei din laptele matern asupra imunoglobulinelor (IgA și IgG) din serului sugarilor

2.2.2. Identificarea tulpinilor izolate din laptele matern

1.Identificarea tipurilor de tulpini de bacterii lactice izolate din laptele matern; 2.Precizarea acurateței de identificare pentru fiecare tulpină prin metoda API CH50 în vederea evaluării oportunității folosirii acestei metode ca primă etapă de identificare realizând doar testele metabolice de fermentare a zaharurilor; 3.Precizarea sensibilității metodei de fermentare a zaharurilor pentru identificarea bacteriilor lactice din laptele matern

2.2.3. Creșterea în bioreactor a tulpinilor izolate din laptele matern

1.Studiul diferențelor de performanță (DO maximă) între diferitele tulpini izolate din probele de lapte matern; 2.Studiul combinației optime a parametrilor pH, concentrație de oxigen, temperatură corelate cu valori maxime ale densității optice pentru fiecare tulpina.

2.2.4. Evaluare rezistență tulpini in diferite medii de creștere

1. Studiul rezistenței fiecărei tulpini în mediul cu pepsina, mediul cu bilă și respectiv mediul cu HCl, medii care simulează în vitro mediul gastrointestinal

2.2.5. Microîncapsulare

1.Analiza mediei diametrelor microcapsulelor obținute prin emulsie (metoda1)versus media diametrelor microcapsulelor obținute prin extruzie (metoda 2); 2.Analiza influenței concentrației alginatului de sodiu asupra diametrelor microcapsulelor obținute prin extruzie (metodele 3 și 4) realizând și corelații cu forma acestora; 3) Analiza grosimii peretelui microcapsulelor obținute prin toate cele 4 metode; 4) Analiza influenței concentrației alginatului de sodiu asupra grosimii microcapsulelor obținute prin metodele 3 și 4 (folosind practic combinații diferite ale soluțiilor și substanțelor utilizate)

Partea Documentară

Capitolul 3

Taxonomia probioticelor

3.1. Generalități

Probioticele sunt foarte importante în aplicațiile industriale, conceptul de probiotic este deschis la foarte multe aplicații diferite într-o varietate largă de domenii relevante pentru sănătatea umană și animală. Produsele probiotice constau în diferite enzime, vitamine, capsule sau tablete și câteva alimente fermentate care conțin microorganisme cu efecte benefice asupra sănătății. Pot conține una sau mai multe specii de bacterii probiotice, majoritatea produselor destinate consumului uman sunt produse de laptele fermentat sau se administrează sub formă de tablete sau pulberi. Capsulele sau tabletele sunt folosite pentru suportul sănătății. Consumul de microorganisme probiotice produce un efect protectiv asupra florei intestinale. Există foarte multe studii care arată efectele benefice asupra dezechilibrelor microbiene intestinale, dar este realmente dificil de arătat efectele clinice ale acestor produse. Folosirea probioticelor protejează pacienții de diferite boli intestinale, exemplu: diareea călătorului, diareea asociată cu antibiotice, boala diareică acută, intoleranță la lactoză, cancerul de colon, infecția cu *Helicobacter Pylori*, precum și de alte afecțiuni, de exemplu HTA, boli inflamatorii cronice, boli alergice, osteoporoza, infecții urogenitale și boli autoimune[27,36].

3.2 Istoric

Termenul de probiotic derivă din grecescul “ pro bios” adică pentru viață, în antiteză cu “antibiotic” care se traduce “împotriva vieții”. Este cunoscut faptul că încă din antichitate grecii și romanii consumau alimente și băuturi fermentate. În anul 1908 Elie Metchnikoff, laureat al premiului Nobel a propus efectele benefice ale microorganismelor probiotice asupra sănătății umane. Termenul de “probiotic” a fost folosit în 1965 de către Lilly și Stillwell pentru a descrie substanțele care stimulează creșterea altor microorganisme. După anul 1965 termenul a fost folosit în concordanță cu mecanismul prin care probioticul acționează și influențează sănătatea.

În anul 1974 Parker a definit probioticele ca substanțe și organisme care contribuie la balanța microbială intestinală. În anul 1989 Fuller a definit probioticul ca supliment microbial viu care influențează pozitiv sănătatea prin îmbunătățirea balanței microbiene intestinale. În anii care au urmat mai mulți cercetători au studiat probioticele și au completat definițiile: 1. Organisme vii care ingerate în anumite cantități determină beneficii de sănătate pe lângă proprietățile nutriționale de bază; 2. Adjuvant microbial în dietă care afectează benefic fiziologia gazdei prin modularea imunității mucoase și sistemice, și îmbunătățirea balanței microbiene și nutriționale în tractul intestinal (Naidu et al 1999); 3. Un ingredient microbial viu, benefic sănătății (Salminen et al 1998); 4. O preparare de produs conținând microorganisme viabile în număr suficient care alterează microflora (prin implantare și colonizare) în compartimentul gazdei și care exercită efecte de sănătate benefice asupra gazdei Schrezenmeir și de Vresse 2001; 5. Microorganisme vii care atunci când sunt administrate în cantități adecvate oferă beneficii de sănătate asupra gazdei - definiție acceptată de FAO/WHO (report în Octombrie 2001) [186].

3.3 Taxonomia microorganismelor probiotice

Termenul de taxonomie, însemnând categorisire în limba greacă, poate fi privit ca un demers pentru a pune ordine în natură (clasificarea respectiv sistematizarea unor domenii reale). Ierarhia taxonomică se bazează pe unitatea numită specii. Speciile sunt grupate apoi într-un Gen, genurile într-o Familie, familiile într-o Ordine, ordinea într-o Clasă, și clasele într-un Domeniu. Trei domenii de viață au fost descrise cuprinzând toate organismele vii, două pentru procariote, Archaea și bacterii, și unul pentru eucariote. În domeniul Eukarya, există patru subdomenii, de asemenea, recunoscute, de exemplu, Protista, Ciuperci, Animalia, Plantae.

Tulpinile de probiotice sunt definite ca subculturi de miliarde de celule aproape identice în mod ideal, derivate din aceeași celulă mamă. Tulpinile de probiotice descrise până la momentul actual se împart în 2 grupuri diferite de microorganisme, și anume bacterii și ciuperci.

Ordinile taxonomice pentru microorganisme sunt specii, gen, familie, ordine, clasă, încregătură, și domeniu. Cu excepția domeniului, acestea sunt rar folosite. [36,186].

3.4 Genul *Lactobacillus*

Genul *Lactobacillus* aparține LAB (bacterii lactice), o definiție care grupează speciile de bacterii Gram-pozitive, neformatoare de spori, catalazo-negative care produc acid lactic, ca produs final principal de fermentare a carbohidraților. Catalaza este o enzimă ce se găsește în aproape toate organismele vii, care sunt expuse la oxigen, descompunând peroxidul de hidrogen în apă și oxigen.

Având în vedere compoziția de bază a ADN-ului genomic, prezintă de obicei, un conținut de GC(guanină și citozină) între 32 și 51 mol%. Conținutul de guanină-citozină este procentul acestor baze azotate în molecula de ADN, dacă ne referim la toate cele 4 baze diferite inclusiv adenina și timina. Bazat pe schema taxonomică a procariotelor genul *Lactobacillus* aparține încregăturii Firmicutes, clasa Bacili, ordinul Lactobacillales, familia Lactobacillaceae cu rudele sale cele mai apropiate, fiind grupate în cadrul aceleiași familii, reprezentate de *Paralactobacillus* genurile și *Pediococcus*. În anul 2009, genul *Lactobacillus* cuprindea 116 de specii valabile, ceea ce face, genul cel mai numeros din ordinul Lactobacillales. Au mai fost descrise și alte specii (*Lactobacillus tuceti*, *farraginis Lactobacillus*, și *Parafarraginis Lactobacillus*, *Lactobacillus secaliphilus* fiind în curs de validare.[36]

3.5 Genul *Bifidobacterium*

Bifidobacteriile sunt bacterii Gram-pozitive în forme de tije ramificate polimorfe, care apar singure, în lanțuri sau grupuri. Au diverse forme, inclusiv tije scurte, curbate, bifurcate. Numele lor provine de la observația că acestea există de multe ori într-o formă de Y sau bifidoforme. Nu formează spori, sunt nonmotile, și non filamentoase. Sunt anaerobe și chemoorganotrofe, având un tip fermentativ de metabolism. Produc acid, dar nu și gaz dintr-o varietate de carbohidrați. Sunt catalazo-negative, cu unele excepții, cum ar fi *Bifidobacterium indicum* și *Bifidobacterium asteroides* atunci când cresc în prezența aerului. Conținutul GC genomic variază de la 42 la 67% mol.

Bifidobacteriile degradează hexozele folosind o cale metabolică unică menționată ca și calea fructoza-6-fosfat, de asemenea cunoscută sub numele de șunt bifid. Genul *Bifidobacterium* aparține încregăturii Actinobacteria, clasa Actinobacteria subclasa Actinobacteridae, ordinul Bifidobacteriales, familia Bifidobacteriaceae. Următoarele genuri, nu sunt genuri care fac parte din această familie, dar sunt considerate probiotice și includ *Aeriscardovia*, *Falcivibrio*, *Gardnerella*,

Parascardovia, și Scardovia. În anul 2009, 30 de specii de Bifidobacterium au fost izolate, validate, și identificate [36,186].

Capitolul 4

Probioticele și sănătatea

4.1 Introducere

Probioticele sunt considerate ca promotoare ale sănătății, totuși mecanismele de suport nu au fost încă explicate. Există studii referitoare la modul în care acționează probioticele: 1. producerea de substanțe inhibitorii (acizi organici, hidrogen peroxid și bacteriocine inhibitorii atât pentru gram pozitivi cât și pentru gram negativi, 2. blocarea situsurilor de adezivitate (probioticele și bacteriile patogene sunt în competiție, probioticele aderă de suprafața celulelor epiteliale ocupând zonele de adezivitate, 3. competiția pentru nutrienți (deși nu există studii în vivo probioticele inhibă patogenii prin consumul nutrienților necesari pentru agenții patogeni) 4. stimularea imunității (specifice și nespecifice se pare prin anumite componente specifice ale peretelui celular care pot constitui stimulanti pentru creșterea răspunsului imun umoral, 5. degradarea receptorului toxic pe mucoasa intestinală, exemplu Streptomyces bouhardi protejează gazda împotriva infecției intestinale cu Clostridium difficile; alte mecanisme presupun supresia producției de toxine, reducerea pH-lui intestinal, atenuarea virulenței, 6. supresia substanțelor carcinogenice prin legare, blocare sau îndepărtare, 7. modificarea pH-lui intestinal cu consecințe de alterare a activității microflorei și a solubilității biliare [36,186], 8. Scăderea nivelului seric de colesterol [18,164].

4.2 Efectele probioticelor în enterocolite

Există multe studii și date referitoare la efectele benefice ale probioticelor pe câteva tipuri de diaree. La copiii cu diaree provocată de rotavirus, Lactobacillus rhamnosus GG, Acidophilus, LB1, Bifidobacterium Lactis și Lactobacillus Reuteri, sunt raportate ca fiind într-adevăr eficiente (scad durata infecției cu rotavirus). Probioticele prezintă efecte benefice și în prevenirea unor forme de boală diareică acută (Lactobacillus rhamnosus GG, Acidophilus, Bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium bifidum). [36,186].

4.3 Efectele probioticelor în infecția cu Helicobacter pylori

Helicobacter pylori este un microorganism gram negativ care colonizează mucoasa stomacului cauzând gastrita cronică activă, boala ulceroasă și cancerul gastric. Speciile de lactobacilli inhibă activitatea H.pylori prin: 1. sinteza de compuși antibacterieni (amicoumacin A – Bacillus subtilis); 2. ocuparea receptorilor de suprafață exprimați la nivelul celulelor epiteliale (Lactobacillus Reuteri-JCM 1081 și TM 105 se leagă de ganglioizidele și sulfatidele exprimate pe membrana plasmatică epitelială); 3. stimularea proteinelor de șoc termic asociate suprafeței celulare (GroEL) exprimate de microorganisme producătoare de acid lactic cu rol în agregarea Helicobacter Pylori și prevenirea aderenței acestuia de celulele epiteliale; 4. Substanțe proteozosensibile elaborate de Bifidobacterium; 5. Inhibarea interleukinei IL-8 și a răspunsului chemotactic pentru PMN în zonele de inflamație din jurul celulelor epiteliale gastrice infectate.

4.4 Efectele probioticelor în infecțiile respiratorii

Recent s-a sugerat faptul că lactobaciliile ar putea induce un efect pozitiv imunomodulant și la nivelul altor mucoase decât cea digestivă (tractul respirator). Mai mult decât atât potențialul terapeutic al probioticelor în infecțiile de căi respiratorii superioare poate deriva din abilitatea lor de a modula sistemul imun. De fapt lactobaciliile pot stimula limfocitele B din GALT și pot determina migrarea lor în tractul respirator superior având drept rezultat o secreție mult mai bună de IgA. Hatakka et al Finlanda [36,186] au arătat că Lactobacillus GG ($1.3-2.6 \times 10^8$ CFU) poate reduce incidența și severitatea infecțiilor respiratorii la copiii din colectivități. Într-un studiu prospectiv RCT, Weizmann et al au arătat că administrarea la copiii cu vârste cuprinse între 4 și 10 luni de formule cu supliment de Lactobacillus Reuteri a avut drept consecință mai puține episoade de febra și de vizite la medic [36,186].

4.5 Efectele probioticelor în cancer

Studii epidemiologice au arătat creșterea incidenței cancerului de colon prin consumul de grăsimi saturate (țările occidentale). Se presupune că probioticele reduc riscul de cancer prin scăderea activității enzimelor bacteriene, supresia carcinogenilor prin legare, îndepărtare, supresia creșterii bacteriene favorabile conversiei de procarcinogene către carcinogene, modificarea pH-ului intestinal, alterarea timpului de tranzit colonic cu îndepărtarea mutagenilor fecali mai eficient, stimularea sistemului imun [36,186].

4.6 Efectele probioticelor în alergii

La naștere sugarii prezintă nivele crescute de citokine ale Th2 de la mama. Balanța Th1/Th2 este reechilibrată pe măsură ce se colonizează intestinul după naștere. La sugari boala alergică se bazează pe alergii alimentare mediate IgE și un răspuns exagerat din partea Th2. Kalliomakki et al, 2001 au arătat că sugarii alergici prezintă un număr mai redus de Bifidobacterium în fecale. Yoshida et al 2004 au arătat că administrarea de rafinoză și oligozaharide bazate pe alginat induc scăderea răspunsului Th2, probabil prin stimularea răspunsului Th1 și rebalansarea răspunsului imun cu creșterea citokinelor antiinflamatorii (IL-10 și TGF- β). [36,186]

4.7 Efectele probioticelor asupra sistemului imun

Mecanismele prin care bacteriile probiotice pot avea efecte pozitive asupra sistemului imun nu sunt încă complet înțelese. Probioticele afectează sistemul imun în diferite moduri ca de exemplu: cresc producția citokinică, stimulează macrofagele, cresc concentrațiile de IgA secretor. Câteva din aceste efecte sunt legate de capacitatea de adezivitate a probioticelor, în timp ce altele nu au legătură cu acest mecanism. Există studii care demonstrează atât creșterea concentrației serice de IgA cât și stimularea activității macrofagelor și a producției de γ -interferon [36,186].

4.8 Efectele probioticelor în infecțiile urinare

Metaanalize realizate în anul 2008 pe această temă au arătat faptul că din 14 trialuri clinice referitoare la administrarea de probiotice pentru îmbunătățirea sănătății urogenitale, 6 au evidențiat ca există tulpini care ar putea normaliza flora tractului urogenital și eficientiza tratamentul antibiotic în infecțiile urogenitale. Lactobaciliile probabil au capacitatea de imunomodulare la nivelul mucoasei tractului urogenital. Mecanismele prin care se reduc nivelele interleukinei IL-1 β

la nivel vaginal, IL-6 la nivelul vezicii urinare, modularea raportului Th1/Th2, sunt incomplet cunoscute, existând mai multe studii în vivo/in vitro pentru elucidarea mecanismelor [36,186].

Capitolul 5

Metode de izolare și cultivare a tulpinilor de probiotice

5.1 Introducere

Diferitele microorganisme benefice și cel mai important bacteriile lactice, au evoluat și s-au adaptat să trăiască în asocieri simbiotică între ele și, în majoritatea locațiilor gazdei lor, inclusiv pielea și tractul gastro-intestinal (GIT). Unele dintre cele mai bune bacterii probiotice includ membri ai genurilor *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*.

Bacteriile lactice sunt utilizate pe scară largă în producția de alimente fermentate și sunt considerate ca fiind sigure (GRAS), în general fiind organisme care se utilizează în condiții de siguranță în funcții medicale și sanitar-veterinare [14,36,111].

Criteriile utilizate pentru selectarea în vitro de bacterii probiotice pentru preparate alimentare, care să le permită stabilirea în tactul intestinal, includ toleranța la bilă și rezistența la suc gastric, care le permite să supraviețuiască și să crească pentru a-si exercita acțiunea în tractul gastro-intestinal (GIT). Deși limita de toleranță necesară pentru creșterea maximă în GIT nu este cunoscută, este logic ca cele mai rezistente specii să fie selectate [36,113].

5.2 Izolarea bacteriilor lactice

5.2.1. Izolare din iaurt și alte produse lactate

Bacteriile probiotice sunt enumerate și izolate din iaurt și produse lactate probiotice disponibile în comerț. *Lactobacillus Delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* sunt enumerate și izolate utilizând MRS agar, incubate anaerob, la 37°C pentru 72 de ore. M17 agar este utilizat pentru enumerarea și izolarea de *Streptococcus thermophilus*. MRS agar și MRS agar modificat (MRS + L-cisteina + LiCl + Na propionat), sunt utilizate pentru izolarea și enumerarea de bacterii probiotice [36].

5.2.2 Izolarea bacteriilor lactice din laptele uman

Materialul utilizat pentru izolare este laptele uman obținut de la mame voluntare sănătoase. Probele se recoltează în recoltoare sterile și stocate în gheață până la livrarea la laborator. Odată livrate în laborator se inițiază procedura de izolare. Se utilizează tehnica plăcii pentru a izola organisme. După incubare, coloniile individuale sunt selectate și transferate în medii sterile cu bulion. Următorul pas este purificarea coloniilor selectate cu tehnica de placă "Streak" [98,99,102,113,117]. Izolatele sunt examinate în funcție de morfologia coloniei, reacția catalazei și reacția gram. Coloniile de coci și bacili Gram pozitivi și catalazo-negativi sunt trecute pe glicerol ca și bacterii lactice [121, 142,165,184,188,189,190].

5.3 Identificarea fenotipică

Caracterizarea morfologică se realizează prin examinarea creșterii coloniei, morfologia celulară, și reacția Gram. Se realizează de asemenea, testul catalazei [14,15,20,48,85,88]. Izolatele dovedite a fi Gram pozitive și catalazo-negative sunt supuse la caracterizării biochimice folosind API de 50 CHL kit (bioMérieux) [142,165,184,188,189,190].

5.4 Evaluarea în vitro a tulpinilor bacteriene potențial probiotice

Evaluarea bacteriilor cu potențial de probiotice implică evaluarea rezistenței la aciditatea gastrică și toxicitate a bilei, aderarea la țesutul epitelial intestinal, abilitatea de a coloniza tractul gastro-intestinal, producția de substanțe antimicrobiene, precum și capacitatea de a modula răspunsurile imune[94,98,99,102,113,117,121].

5.4.1 Rezistența la acid gastric

Bacteriile probiotice trebuie să supraviețuiască tranzitului prin stomac. Secreția de acid gastric constituie primul mecanism de apărare împotriva celor mai multe microorganisme ingerate.

Supraviețuirea tulpinilor bacteriene este inițial evaluată prin adăugarea 1×10^9 și 1×10^{11} CFU lactobacili și respectiv, Bifidobacterium/L, la un mediu MRS modificat cu acid clorhidric până la valorile pH-ului între 2,0 și 3,4. Bifidobacteriile, s-au dovedit mai puțin rezistente la acid comparativ cu lactobacili, în special atunci când sunt expuse la sucul gastric uman[36,184].

5.4.2. Rezistența la acizi biliari

La evaluarea potențialului de utilizare a bacteriilor lactice probiotice ca și probiotice eficiente, este în general considerată necesară și evaluarea capacitații lor de a rezista la efectele acizilor biliari. Mediile solide pot fi completate cu bilă bovină (ex. Sigma Chemical, Poole, Marea Britanie), bilă porcina (ex. Sigma), și umană (obținută prin colecistectomie laparoscopică), până la concentrații finale între 0,3% și 7,5%. Aceste plăci pot fi incubate la 37°C , în condiții anaerobe, creșterea fiind înregistrată după 24-48 de ore.[36,184].

5.4.3. Concentrația bacteriană

Diferitele substraturi utilizate în evaluarea adeziunii probioticelor au nivele diferite de locusuri potențiale de legare. Luând în considerare secrețiile gastrointestinale, trebuie să fie utilizate concentrațiile de probiotice relevante din punct de vedere fiziologic. Consumul de 10^8 unități formatoare de colonii (CFU) / ml, poate duce la concentrații de $10^5 - 10^6$ CFU / ml, în intestinul subțire, presupunând că nici o creștere nu are loc în timpul trecerii prin tactul gastrointestinal superior. În testele de adezivitate bacteriană sunt de obicei utilizate concentrații de 10^7-10^9 CFU /ml. [94,184,186].

5.4.4 Timpul de incubație

Efectul timpului de incubație asupra adezivității probioticelor nu a fost pe deplin investigat. În cele mai multe teste, probioticele sunt incubate timp de 12 h, cu substrat. Unii cercetători au raportat un efect mic sau absent al timpului de incubație asupra nivelului de aderență al bacteriilor propionice și al bifidobacteriilor. Cu toate acestea, timpul de incubație poate avea o influență majoră asupra aderenței observate. Acest fenomen poate fi explicat prin sedimentarea microbilor [94,184,186].

În ceea ce privește alegerea optimă a unui microorganism probiotic trebuie avute în vedere pe cât posibil, următoarele: 1. tulpina microbiană trebuie să prezinte rezistență față de enzimele litice salivare și din tubul digestiv; 2. să reziste la pH-ul scăzut din stomac (1.5-3.0) mai mult de câteva ore; 3. să fie rezistentă la acțiunea sărurilor biliare (în mod normal, microflora autohtonă nu prezintă probleme); 4. probioticul trebuie să producă un pH scăzut pentru a preveni dezvoltarea germenilor patogeni și pentru a reduce producerea de toxine și alte substanțe nedorite; 5. să fie rezistentă la antibioticele adăugate în hrană; 6. tulpina microbiană utilizată trebuie să prezinte

capacitatea de aderare la celulele peretelui intestinal; 7. bacteriile trebuie să se afle în stare vie (ușor de proliferat în vivo și în vitro); 8. este importantă rezistența microorganismului utilizat ca probiotic în procesul tehnologic de obținere a preparatului final[36, 94,184,186].

5.5. Izolarea și selecția.

Microorganismele existente în diferite habitate se izolează și se selectează, cultivându-se pe medii solide sau lichide, în vederea studiului unor caracteristici fiziologice. În prima fază se obține cultură pură folosind tehnici consacrate de microbiologie (epuizarea ansei, diluții succesive). În a doua fază se triază microorganismele prin cultivare pe plăci Petri, pe medii solidificate cu Agar-Agar [94].

5.5.1 Întreținerea tulpinilor.

După etapele de izolare și selecție, tulpinile se caracterizează folosind metode de morfologie, biochimice, fiziologice, imunologice, toxicologice. Tulpina caracterizată se înregistrează într-o colecție de microorganisme folosind un număr de identificare.

Atât tulpinile originale cât și tulpinile mutante sunt conservate prin metode speciale și păstrate la temperaturi scăzute de exemplu prin liofilizare sau prin conservare în azot lichid. Cultura stoc este de referință pentru procesul de biosinteză și se păstrează la frigider, pe geloza nutritivă, în tub inclinat. Cultura inocul are ca sursă cultura stoc[94].

5.5.2 Materii prime utilizate pentru dezvoltare.

Laptele este un mediu propice pentru întreținerea și cultivarea lactobacililor dar și alte medii gen plămezi amidonoase de porumb sau cartof, zaharificate sau zerul de la fabricarea brânzeturilor, melasa [94]. Bacteriile lactice fermentează următoarele glucide: glucoza, fructoza, galactoza, manoza, ramnoza, arabinoza, xiloza[94].

5.6 Condiții de cultivare și obținere a probioticelor

Etapele de obținere a probioticelor sunt reprezentate de: 1. Izolarea probioticelor din sursă, 2. Obținerea culturii stoc, 3. Obținerea inoculului, 4. Fermentația la nivel de flacoane, 5. Biosinteza la nivel micropilot, 6. Prelucrarea mediului de cultură - Jurcoane et al 2004 [94].

Cultura de studiu se obține prin întreținerea culturilor stoc pe medii nutritive agarizate în tuburi inclinate. Mediul de întreținere se testează pentru fiecare microorganism [79,81,94,120,125,150,175].

5.6.1 Cultura de inocul.

Cultura studiu se multiplică dacă se asigură un substrat nutritiv optim de dezvoltare care presupune o combinație optimă a următorilor parametri : pH, temperatură, agitare, concentrație de oxigen. Cultura astfel multiplicată poate fi însământată din mediul de sinteză propriu-zis în bioreactor, în condiții aseptice, după o anumită perioadă de dezvoltare Jurcoane et al 2004 [94].

5.6.2 Biosinteza la nivel micropilot.

Se tatonează mai multe medii de biosinteză cu diferite substraturi nutritive, alegându-se în final mediul optim de biosinteză. Se are în vedere de asemenea evaluarea parametrilor optimi de cultivare în bioreactor (temperatură, pH, concentrație O₂ dizolvat)[2,7,9,24,43,68,70]. Se monitorizează creșterea numărului total de germeni/ml (NTG/ml) prin măsurarea densității optice

din oră în oră. Pentru probiotice se apreciază NTG/ml mai mare sau egal cu 10^7 ca pragul orientativ pentru încheierea etapei de biosinteză Jurcoane et al 2004 [94].

Capitolul 6

Factori bioactivi din laptele matern

6.1 Introducere

Laptele matern îndeplinește toate necesitățile nutriționale al nou-născutului, protejează nou-născutul împotriva bolilor infecțioase (Martin et al 2010) prin compușii antimicrobieni , imunoglobuline, celule imunocompetente , substanțe prebiotice[140,141,179]. Compoziția laptelui matern este următoarea: 1.grasimi: AG, PUFA-AG, 2. proteine: cazeina, α -lactalbumina, albumina, β -lactoglobulina, lactoferina, IgA, IgG, lizozimul, 3. carbohidrați: oligozaharide, lactoza, 4.minerale: Ca, fosfor, sodiu, potasiu, clor, 5.factori bioactivi[86,126,140,179].

În pofida caracterului său complex laptele uman poate fi ușor fracționat prin centrifugare în cele trei componente majore și anume : 1 zer solubil, 2 micelii de cazeină , și 3. globulele de grăsime din lapte (MFGs plutitoare)[17,44,78,86,121].

Laptele matern conține diferite componente necesare nou-născutului pentru creștere și dezvoltare. Printre aceste componente, proteine specifice din lapte și proteine plasmatică, cum ar fi β -cazeina (b-CN), kapa-cazeina (k-CN), α -lactalbumina (a-LA), albumina serică(SA), lactoferina (LF), lizozimul (LZ), imunoglobuline A (IgA), C3, C4 (fracțiunile complementului) care au funcții importante nutritive și imunologice[44,64,86,140,179].

6.2 Nefelometrie versus turbidimetrie

Numeroase metode au fost raportate ca teste utilizate pentru analiza acestor proteine din laptele uman: 1. Diferite tipuri de imunoteste, 2. Măsurarea activității enzimatică, 3. Electroforeza în gel de poliacril amidă 4. Cromatografia proteinelor în mediu lichid, 5. Cromatografia prin schimburi ionice. La baza metodei nefelometrice și turbidimetrice de analiză stă fenomenul difuziunii sau a absorbției luminii de către particulele solide sau coloidale care se găsesc într-o soluție[126].

6.2.1 Metoda nefelometrică

Nefelometria se numește acea metodă bazată pe măsurarea intensității unui flux luminos difuzat de către particulele solide ce se află într-o soluție, conform ecuației lui Rayleigh. Metoda nefelometrică se aplică soluțiilor coloidale (cu particule fine), iar determinările depind de volumul particulelor în suspensie. Conform ecuației lui Rayleigh, cantitatea de lumină difuzată crește cu mărirea dimensiunilor particulelor la o aceeași cantitate totală de substanță în suspensie. Suspensiile trebuie să fie stabile în timp și să nu se depună când stau în repaus. Pentru mărirea stabilității suspensiilor, se folosesc deseori coloizii de protecție.

6.2.2 Metoda turbidimetrică

Turbidimetria se numește metoda bazată pe măsurarea slăbirii intensității unui flux luminos care a trecut printr-o soluție ce conține particulele solide datorită absorbției și difuziunii fluxului luminos. Coeficientul de turbulență f este proporțional cu concentrația particulelor în suspensie, de aceea, pentru turbidimetrie ecuația fundamentală are forma analogă ecuației lui Bouguer-Lambert-Beer.

6.2.3 Nefelometria utilizată în analiza laptelui

Reprezintă analiza imunologică a proteinelor din laptele uman (b-caseina, k-caseina, α -lactalbumina, albumina serică, lactoferina, și lizozimul). Imunonefelometria convențională se bazează pe cuantificarea nefelometrică a luminii difuzate de complexe antigen-anticorp formate în timpul fazei lichide a reacției de imunoprecipitare, și este de obicei folosită pentru determinarea proteinelor serice umane, inclusiv IgA, și fracțiunile complementului C3, C4. Această tehnică permite măsurarea de IgA, fracțiunile complementului în laptele uman matur C3, C4 cu precizie și acuratețe[136].

6.3 Factorii bioactivi din lapte

6.3.1 Proteinele

Proteinele, ca un grup nutrient major, conțin un număr important de factori bioactivi, incluzând imunoglobulinele, lactoferina, lizozimul, lactalbumina, și cazeina. Imunoglobulinele specifice din laptele matern (predominant IgAs, și mai puțin IgM, IgG), funcționează legându-se direct la antigene microbiene specifice, blocând legarea și adeziunea, crescând fagocitoza, modulând funcția imună locală, și astfel contribuie la dezvoltarea sistemului imunitar al copilului. Lactoferina prin chelarea fierului (limitează creșterea bacteriilor siderofilice), blochează adeziunea bacteriană și blochează adsorbția/penetrarea virusilor, contribuie la dezvoltarea celulelor intestinale și refacerea acestora (prin menținerea unei bariere efective), și la scăderea producției de IL-1,-2,-6, și TNF- α de la monocite (modularea sistemului imun)[17,44,45,57]. Lizozimul determină liza peretelui celular bacterian, se leagă de endotoxină (limitând efectul), crește producția de IgA, și contribuie la activarea macrofagelor (efecte imunomodulatoare). Lactalbumina transportatoare de calciu, este o parte esențială a complexului enzimatic, care sintetizează lactoza, și susține creșterea Bifidobacteriilor. După modificarea din intestin, o Lactalbumină numită "lactalbumina umana care distruge celulele tumorale" pare să aibă rol în apoptoza celulelor maligne (modulare imună și protecție imună). Cazeina inhibă adeziunea diferitelor bacterii în diferite locus-uri epiteliale și promovează creșterea Bifidobacteriilor [64,86,114,140,179].

6.3.2 Carbohidrații

Carbohidrații din laptele matern sunt lactoza și oligozaharidele ca și componente majore și compușii glicoconjugați. Ei funcționează ca principale substanțe nutritive în producerea de energie. Oligozaharidele acționează ca prebiotice stimulând creșterea de Lactobacillus și de Bifidobacterium și legându-se de antigeni microbieni. Compușii glicoconjugați leagă liganzi specifici bacterieni (*V. cholerae*) și liganzi virali (rotavirus). Oligozaharidele din lapte sunt în principal derivate din lactoză. Aproape toate transportă unitatea de lactoză până la reducerea finală a acesteia; câteva glicoziltransferaze adaugă mai multe monozaharide la această structură

de bază pentru a sintetiza oligozaharide complexe. Laptele uman este unic în conținutul său complex de oligozaharide (12 la 14g/L), incluzând atât forma neutră (90%) și sialilată (10%).

6.3.3 Lipidele și vitaminele

Lipidele, al treilea nutrient major și sursa de energie din laptele matern, includ trigliceride, acizi grași polinesaturați cu lanț lung (LC-PUFA). Acestea au un efect litic asupra unei game variate de viruși, protozoare, în special față de Giardia. Vitaminele A, C, E, în plus față de efectele lor nutritive, au efecte antiinflamatoare datorate eliminării radicalilor de oxigen. Diferite enzime din laptele uman au funcții duale: catalaza are efecte antiinflamatorii datorate degradării H₂O₂, și glutatation peroxidaza scade inflamația prevenind peroxidarea lipidică[17,140].

6.3.4 Nucleotidele, nucleozidele și acizii nucleici

Nucleotidele, nucleozidele, acizii nucleici, și produsele legate de acestea constituie aproximativ 15 până la 20% din azotul non proteic conținut în laptele matern. Experimentele în vivo și în vitro sugerează o varietate de roluri pentru nucleotidele ingerate: creșterea absorbției de fier; creșterea de Bifidobacterium, îmbunătățirea creșterii, dezvoltarea și refacerea mucoasei gastrointestinale, și creșterea activității celulelor NK și a producției de IL-2. Mai multe studii clinice pe copii, care au primit formule de lapte suplimentate cu nucleotide, au arătat mici beneficii, cu mai puține episoade de diaree și niveluri plasmatice mai mari de IgM și IgA la grupurile care au primit aceste suplimente.

Există un număr de agenți prezenți în laptele matern uman, care sunt considerați factori de modulare imună. Majoritatea acestor factori sunt citokine, dar sunt prezenți, de asemenea, în laptele uman și receptori solubili ai acestor citokine. Lista include IL-1, -3, -4, -5, -6, -8, -10, -12, IFN- α , TNF- α și TGF- β , TGF- α , IL-10, și receptorii pentru TNF- α care sunt asociați cu efecte antiinflamatoare. Efectele fiziologice reale și funcțiile fiecăruia dintre acești factori la copil nu au fost elucidate[17,140].

Capitolul 7

Principii de încapsulare

7.1 Materiale de încapsulat

7.1.1 Alginatul

Alginatul este cel mai comun biomaterial folosit pentru încapsularea probioticelor. Polizaharid natural extras din diferite tipuri de alge (mai ales algele brune), compus din blocuri α -L-guluronic(G) și respectiv blocuri β -D-mannuronice (M) reprezintă cel mai studiat material de încapsulare. Raportul M/G determină funcționalitatea tehnologică a alginatului. Rezistența gelului de alginat este dată de proporția înaltă de (G)[4,5, 10, 35, 40]. Microcapsulele de alginat pot fi obținute prin extruzie și emulsie - gelul de alginat este susceptibil la precipitare în prezența ionilor de calciu bivalenți Ca^{2+} în exces sau în prezența agenților chelatori. Soluția de alginat poate fi mixată cu medii cu lichide conținând probiotice (MRS) apoi picurată în soluție de $CaCl_2$ pentru solidificare. Încărcarea maximă celulară în microcapsule se limitează la 25% din volum [46, 55, 56, 60, 62, 66].

7.1.2 Chitosanul

Chitosanul este un polizaharid încărcat pozitiv și se formează prin deacetilarea chitinei. Este preferat a fi folosit ca și înveliș și nu ca o capsulă. Se folosește frecvent împreună cu alginatul. Capsula de chitosan oferă cea mai bună protecție în soluția de sare biliară atunci când are loc un schimb ionic la absorbția sării biliare. Chitosanul se pare ca are efecte inhibitorii asupra bacteriilor lactice dar și asupra altor bacterii, viruși, fungi. Lipsa de solubilitate în apă reprezintă un dezavantaj în prevenirea eliberării complete a acestui biomaterial în intestin care are un pH mai mare de 5.4 astfel că se limitează practic aplicabilitatea sa în produse nutraceutice [156,166,187].

7.1.3 Guma xanthanică

Este un polizaharid sintetizat prin fermentare aerobică de către *Xanthomonas campestris*. Constă din reziduuri de D-glucoză legate 1.4 β având un lanț trizaharidic lateral atașat de reziduuri d-glucozil 0-3 succesive. Lanțurile laterale prezintă legate în poziția α D-manopyranoza, în poziția β D-mannopyranoza (4-1) și în poziția β -acid β -D-glucuronic (2-1) care determină proprietățile anionice ale acestui hidrocoloid. Se folosește în combinație cu gelanul pentru încapsularea probioticelor [27,132].

7.1.4 Guma gelanică:

Este un heteropolizaharid liniar anionic având o unitate tetrazaharidică repetitivă alcătuită din ramnoza D-glucoza și acid D-glucuronic în raport de 1:2:1 Are potențial pentru înlocuirea parțială sau totală a agarților gelifianti. [27,46,132].

7. 1.5 Carrageenan:

Pot fi obținute din algele marine roșii. Sunt polizaharide sulfatate anionice lineare compuse din reziduuri D-galactopyranoza legate prin legături alternative alternante α - (1/3) și β - (1/4). Carrageenan se prezintă sub forma a 3 tipuri k, l, λ după modificarea enzimatică a

substraturilor (fracțiunea - μ , fracțiunea - δ , fracțiunea - σ) care diferă în structura lor dizaharidă. k-Carrageenanul matrice împreună cu bacteriile lactice imobilizate poate fi emulsificat într-un ulei vegetal stabil, într-un reactor termostatat [146,169,180].

7.1.6 Ftalat acetat celulozic (CAF)

Celuloza este un polimer de natură înalt hidrofilică în compoziția plantelor și a bacteriilor fiind sigur în utilizare; este folosit pentru controlarea eliberării medicamentelor la nivel intestinal [27, 46, 54, 66]. Avantajul acestui compus este insolubilitatea la pH acid ($\text{pH} < 5$), solubil însă la $\text{pH} > 6$, ceea ce îi conferă proprietăți de protecție excelentă pentru microorganisme în condițiile mediului gastric acid. Dezavantajul CAF este că nu poate forma particule de gel prin gelificare ionotropică. Au fost dezvoltate doar capsule prin emulsifiere și polimerizare interfacială. CAF este folosit pe scară largă ca agent pentru învelișul microcapsulelor Rein et al 2012 [97, 105, 133, 146].

7.1.7 Amidonul

Amidonul este un biopolimer hidrocoloid produs din plante sub forma unor granule de mărimi diferite hidrofiliice. Sursele de amidon sunt reprezentate de: cartofi, porumb, orez, grâu. Amidonul rezistent este cel care rezistă la acțiunea amilazelor pancreatice în intestinul subțire și care ajunge până la nivelul colonului unde poate fi fermentat. Aceasta specificitate îi permite o mai bună capacitate de eliberare în intestinul gros. Amidonul are și funcționalități prebiotice pentru bacteriile încapsulate [112, 115, 132]. Microcapsulele pe baza de amidon au fost obținute de către cercetători în principal prin metode de legare încrucișată prin emulsificare.

7.1.8 Gelatina

Este o proteină obținută prin hidrolizarea colagenului din oase și piele. Gelatina realizează un gel termosensibil și a fost folosită pentru încapsularea probioticelor, singură sau în combinație alți compuși. Grație naturii sale amfoterice, este un candidat excelent pentru cooperarea cu polizaharidele anionice (de exemplu alginatul sau guma gelanică). Nu formează particule, însă poate fi considerată ca și material pentru microîncapsulare ca și material de înveliș. Gelatina și K-carrageenan-ul sunt polimeri foarte des folosiți pentru învelișul microcapsulelor de alginat și chitosan de vreme ce nu prezintă proprietăți satisfăcătoare de încapsulare [156, 168, 181].

7.1.9 Proteinele din lapte

Reprezintă vehicule naturale pentru probiotice, grație proprietăților lor structurale și fizico-chimice. Au proprietăți de gelatizare excelente și această specificitate a fost recent studiată de Heidelbach et al 2009, Livney et al 2010 [27] pentru încapsularea probioticelor. Proprietățile lor fizico-chimice (vâscozitate scăzută, aroma nedefinită, abilitatea de a forma gel) le promovează ca fiind matrici ideale de încapsulare.

7.1.10 Pectinele

Sursa lor este reprezentată de reziduurile provenite din extracția zaharului - pectina reprezintă un biopolimer anionic, solubil în apă și reprezintă un polizaharid. Au aplicabilitate ca și agenți gelifianți și stabilizatori coloidali și emulsificatori, pot fi chimic modificate pentru a modula conținutul lor esteric pentru aplicații specifice [132, 162].

7.2. Microîncapsularea

7.2.1. Introducere, definiții, generalități

Microcapsulele reprezintă particule cu diametrul cuprins în intervalul 1-1000 μ m. Particulele cu diametru sub 1 μ m sunt nanoparticule, iar cele cu diametru peste 1000 μ m se numesc macroparticule [150]. Procesul de microîncapsulare a probioticelor prezintă 3 tipuri de procese : primul proces constă în încorporarea componentului bioactiv (ex probiotice în mediul de creștere) într-o matrice

lichidă sau solidă. Dacă matricea este lichidă încorporarea presupune dispersia sau disoluția în matrice, în vreme ce în cazul miezului solid încorporarea presupune aglomerarea sau adsorbția. În procesul următor matricea lichidă este dispersată, iar în final (al 3-lea proces) apare stabilizarea chimică (polimerizare), fizico-chimică (gelificare) sau fizică (evaporare, solidificare) - Poncelet și Dreffier 2007[27].

7.2.2. Clasificare microcapsule

Microcapsulele pot fi descrise după mai multe caracteristici: 1. în funcție de structură (microsfere omogene sau eterogene), microcapsule uninucleate cu înveliș simplu sau dublu și respectiv multinucleate sferice cu înveliș simplu sau dublu, sau multinucleate neregulate [6,51,71, 95, 108, 158], 2. în funcție de starea de agregare a substanței microîncapsulate (microcapsule cu nucleu lichid și respectiv cu nucleu solid); 3. în funcție de natura polimerului folosit la microîncapsulare (microcapsule pe baza de polimeri sintetici non biodegradabili și respectiv pe baza de polimeri naturali); 4. în funcție de modul de eliberare a substanței active (microcapsule cu eliberare imediată și respectiv cu eliberare modificată/controlată la țintă sau prelungită). Microcapsulele pot forma clustere (aglomerări) în mediul în care au fost obținute [108,150,158].

7.2.3 Membrana

Proprietățile membranei se referă la încărcătura de suprafață și caracterul hidrofob sau hidrofil al microcapsulelor și respectiv gradul de porozitate și grosimea peretelui. Încărcătura electrică de suprafață este evaluată prin determinarea potențialului zeta utilizând anemometria laser Doppler [5, 8,10,47, 58, 96]. Gradul de porozitate este crescut atunci când se folosește alginatul de sodiu, scăzând practic eficiența de protecție a bacteriilor lactice (Gouin 2004) [13,27]. Deficiența poate fi rezolvată folosind 2 tipuri de polimeri de exemplu alginatul de sodiu și amidonul (Truelstrup-Hansen et al 2002, Krasaekoopt et al 2003)[27].

7.2.4. Nucleul

Microcapsulele pot fi uninucleate și respectiv multinucleate cu înveliș simplu sau dublu, sferice sau neregulate. Nucleul poate fi lichid sau solid [150]. Bacteriile lactice (0.5 - 4 μ m diametru) sunt reținute bine în gelul matricial de alginat care se estimează ca are mărimea porilor, mai mici de 7 μ m (Klien et al 1983)[103]. Încărcarea maximă în microcapsule este limitată la 25% din volum din pricina rezistenței mecanice slabe (Ducholz Luttmann, Zakrezwski și Schugerl, 1980).

7.2.5. Diametrul microcapsulelor și concentrațiile polimerilor folosiți

Câteva tehnologii pot fi aplicate în încapsularea probioticelor și fiecare din ele determină microcapsule cu diferite caracteristici în ceea ce privește intervalul de mărimi a particulelor și tipul capsulei. În cazul emulsiei intervalul este cel mai mare cu valori cuprinse între 0.2 și

5000 μm , în timp ce extruzia determina particule peste 300 μm până la 5000 μm . Prin metoda de spray-coating se obțin valori între 5 și 5000 μm [14,23,38 60-64]. În cazul coextruziei intervalul obținut este cuprins între valorile 20 și respectiv 8000 μm (Mc Master et al 2005)[27], iar prin metoda de spray-drying se obțin microcapsule cu valori între 20 și 300 μm . Se remarcă în cazul emulsiei ca intervalul 0.2 - 1 μm este sub valorile bacteriilor lactice (1-5 μm)[27,74,95-100,101,112,118]. Pentru a evita impactul negativ senzorial este de dorit să se obțină microcapsule cu mărimi mai mici de 100 μm (Truelstrup - Hansen et al 2002)[27,62,104,169], (Lahail A et al 2010) [127,166].

7.3. Metode de analiza a microcapsulelor

7.3.1. Determinarea formei și dimensiunii microcapsulelor

Se poate realiza prin diferite metode [27,150]:

1. Metoda microscopică: microscopul optic(1-50 μm), microscopul electronic cu baleiaj (0.05-500 μm), microscopul electronic cu transmisie (0.001-500 μm) [127];
2. Analiza Coulter permite determinarea dimensiunii particulelor în intervalul (0.1-1000 μm);
3. Spectroscopia de corelație fonică se aplică pentru microcapsule cu dimensiuni mai mici de 1 μm ;
4. Anemometria Laser Doppler evaluează încărcătura de suprafață prin determinarea potențialului zeta;
5. Microscopia confocală prin folosirea chitosanului marcat cu FITC care penetrează rețeaua polimerică de alginat de sodiu;
6. În microscopia electronică imaginea se formează prin scanarea cu ajutorul unei raze de electroni a specimenului.

7.3.2. Determinarea concentrației microcapsulelor

1. Turbidimetria este o metodă de măsurare a concentrației unui component într-o soluție. Turbiditatea se referă la gradul de opacitate a unui lichid provocat de particulele aflate în suspensie și care reflectă lumina;
2. Analiza prin spectroscopie este o metoda experimentală prin care se măsoară interacțiunea radiației electromagnetice infraroșii cu substanță [53,131];
3. Analiza termică a matricei care compune microcapsulele presupune un grup de tehnici care măsoară o proprietate fizică a unei substanțe în funcție de temperatură. Pentru analiza matriceală biopolimerică folosită pentru încapsularea probioticelor și a microcapsulelor obținute sunt descrise în literatură: analiza termogravimetrică TGA, analiza termică diferențială TDA, analiza calorimetrică diferențială DSC;
4. Difractometria cu raze X este o tehnică folosită în special pentru analiza pulberilor. Razele X sunt împrăștiate în toate direcțiile. Se măsoară practic unghiurile la care apar maximele de difracție.;
5. Microscopia de forță atomică [26,42,93] este o tehnica în care se măsoară la temperatura camerei folosind un microscop de forță atomică care prin intermediul unui cantilever aplica unui vârf de dimensiuni nano o forță de ordinul pN(piconewtonilor) pe suprafața microcapsulei sau a celulei.

7.4. Metode de încapsulare

7.4.1. Emulsificare și gelificare

Principiul metodei constă în formarea unui amestec între faza continua uleioasă (ulei vegetal-ex de porumb, soia, floarea soarelui, parafina ușoară) și faza discontinuă (dispersată) alcătuită dintr-un amestec între materialul de încapsulat și mediul cu probiotice acestea adăugându-se în volum mic [146,152,153,170].

7.4.2. Extruzia

Extruzia este o metodă fizică de încapsulare a probioticelor în hidrocoloizi (alginat și carrageenan). Mediul cu probiotice se amestecă cu soluția de alginat, apoi suspensia se picură într-o soluție de CaCl_2 pentru solidificare. Se poate proiecta soluția de amestec printr-un vârf la presiuni mari. Extruzia soluțiilor polimerice prin vârfuri pentru a produce capsule la nivel de laborator se realizează cu ajutorul seringilor, prin pulsația jetului sau vibrația vârfului sau prin folosirea fluxului coaxial sau a unui câmp electrostatic.[27,74].

7.4.3 Metoda de dispersie prin atomizare (spray-drying)

Procesul implică dispersia materialului de încapsulat (soluția cu probiotice aflate în stare staționară după creșterea în bioreactor [47] în soluția polimerică, formând o emulsie sau dispersie, urmată de omogenizarea amestecului, apoi de atomizarea amestecului în camera de uscare. Apare procesul de evaporare a solventului (apa) și formarea de microcapsule. Se produc picături, capsulele obținute sunt sub formă de pulbere uscată. Temperaturile înalte scad viabilitatea și reduc activitatea lor în produsul final [11,52,59]. Atât guma arabică cât și amidonul sunt preferate pentru că au tendința de a forma microcapsule sferice în timpul uscării [27].

7.4.4. Spray freeze drying

Metoda este una dintre cele mai folosite pentru producerea de cantități mari de culturi microbiologice concentrate. Prebioticele se afla într-o soluție care este atomizată în vapori la temperaturi scăzute (faza de vapori a unui lichid criogenic de ex azotul lichid). Se generează practic o dispersie a picăturilor înghețate.

7.4.5. Spray chilling

Materialul conținând probiotice este dispersat într-un material lichid încapsulator topit mai degrabă decât în soluția de încapsulat. Solidificarea are loc prin pulverizarea sub formă de spray a amestecului fierbinte într-un flux de aer rece. Se folosesc materiale precum ceruri, acizi grași, alcoolii, polimeri care sunt solizi la temperatura camerei, dar se pot topi la o temperatură rezonabilă [6]. Exemple de polimeri folosiți sunt reprezentate de chitosan și de sodiu carboximetilceluloza [5,6,27,31].

7.4.6. Spray coating

Materialul care realizează învelișul este sub forma solidă și este păstrat în mișcare de un vas special proiectat în acest sens. Se bazează pe dispersia picăturilor topite a materialului de încapsulat pe o suprafața pentru a produce o membrană omogenă. Lichidul pulverizat sau materialul încapsulator poate fi o soluție, o suspensie, o emulsie sau un material topit. Filmul protector sau încapsulat face posibilă protejarea "miezului" probiotic de mediul advers. Prezintă o productivitate înaltă și un potențial mare pentru industria alimentară [27,109].

7.4.7. Coacervarea

Un coacervat este o picătură sferică de molecule organice (specific molecule lipidice) care sunt ținute împreună de forțele hidrofobe. Măsoară între 1 și 100 de micrometrii și posedă proprietăți osmotice. Se formează spontan în soluții organice. Există 2 metode pentru coacervare și anume coacervarea simplă și respectiv coacervarea complexă. În coacervarea simplă un agent dizolvant este adăugat pentru separarea de fază. În coacervarea complexă apare interacțiunea între 2 polimeri cu sarcina electrică opusă [43,117].

Coacervarea complexă se referă la separarea de fază a unui precipitat lichid sau fază atunci când soluțiile celor doi coloizi hidrofilici sunt amestecate în condiții convenabile. Practic întregul proces presupune 3 etape care presupun agitarea continuă a mediului [108].

Partea experimentală

Capitolul 8

Materiale și metode în cercetarea propusă

8.1. Recoltarea și analiza probelor de lapte

Studiul s-a derulat în cadrul Spitalului Clinic de Pediatrie Sibiu în perioada 2011-2012. S-au recoltat 100 probe de lapte astfel: 52 probe de lapte matern și 48 probe de lapte praf în scopul analizei lor biochimice. S-au recoltat de asemenea 100 probe de sânge de la sugari în scopul analizei lor biochimice. Analiza IgA, PCR s-a realizat prin imunoturbidimetrie pe aparatul Hitachi 912, respectiv electroforezele proteinelor pe aparatul Genio. Mostre din fiecare probă de lapte au fost însămânțate pe medii specifice pentru creșterea lactobacililor. Tulpinile izolate din MRS Agar au fost trecute pe MRS broth-bulion (aceleași ingrediente fără Agar) și conservate în culturi cu glicerol (-80°C) în congelatoare.

8.2. Identificarea bacteriană a tulpinilor de *Lactobacillus* spp.

Identificarea tulpinilor izolate și conservate în culturi cu glicerol (-70°C) în congelatoare s-a realizat prin refacerea culturilor în bullion MRS, cultivarea lor pe geloză MRS, incubare în anaerobioză timp de 48 ore (10% CO₂, temperatură 37°C). După obținerea de colonii izolate s-a verificat apartenența tulpinilor izolate la grupul bacteriilor lactice: bacterii Gram (+) pe frotiurile colorate Gram, testul catalazei, oxidazei negative). Identificarea bacteriană a tulpinilor de *Lactobacillus* ssp izolate din laptele matern a fost realizată cu ajutorul galeriilor API 50 CH în cadrul Spitalului Clinic de Pediatrie Sibiu.

8.3 Creșterea tulpinilor izolate din laptele matern în bioreactor

Experimentele s-au realizat în Laboratorul de Microbiologie și Biotehnologii din cadrul Facultății de Științe Agricole Industrie Alimentară și Protecția Mediului. Pentru propagarea inițială a bacteriilor lactice s-a folosit 1 fiolă criogenica stocată la -80°C pentru fiecare tulpină conținând 1 ml. Cultivarea în scopul obținerii biomasei s-a realizat în fermentator IKA, Economy 10, capacitate 2l, termostatabil, cu interfață, senzori de pH, temperatură, oxigen,. Mediul folosit ca substrat a fost mediul al cărui compoziție g/L (Glucoză-25, Extract de drojdie-25, Peptonă-25). Densitatea optica s-a citit folosind un spectofotometru la 600 nm după o diluție adecvată. din oră în oră în intervalul 0-24 ore.

8.4 Evaluarea în vitro a tulpinilor bacteriene potențial probiotice

Experimentele s-au realizat în Laboratorul de Microbiologie și Biotehnologii din cadrul Facultății de Științe Agricole Industrie Alimentară și Protecția Mediului. Tulpinile de bacterii lactice conservate se trec pe mediul MRS agar. După incubare tulpinile de *Lactobacillus* au fost transferate în cele 3 medii de cultură care simulează sucurile digestive (mediile 1-fără bilă cu pepsină, 2-cu bilă, 3-cu HCL). S-a analizat și s-a comparat statistic (testul Anova) pentru fiecare mediu media valorilor densităților optice la fiecare moment de

timp. Pentru fiecare tulpină s-au exprimat procentual creșterile respectiv scăderile față de valorile inițiale

8.5 Microîncapsularea tulpinii de *Lactobacillus Paracasei* ssp *paracasei*(L₁₈)

Încapsularea tulpinii de *Lactobacillus Paracasei* ssp *paracasei* (L₁₈) izolată din laptele matern și conservată în culturi cu glicerol (-70°C) în congelatoare s-a realizat în laboratoarele de biochimie și tehnologie farmaceutică din cadrul Facultății de Medicină V.Papilian din Sibiu, prin refacerea culturii în bulion MRS (suspensie bacteriană) care s-a adăugat în substanța încapsulatoare (alginat de sodiu 2%). S-au folosit 4 metode și anume : metoda 1- emulsionare /gelifiere ionotropica (bullion MRS, *Alginat de sodiu 2%*, *Soluție tampon*, carbonat de calciu 500 mM Ca²⁺ suspensie, *Apă distilată*, CaCl₂ 0,05mMol/l, ulei de floarea soarelui sau alt ulei vegetal, TWEEN 80, Acid acetic 80% și metodele 2,3,4 - Extrudare (Bulion MRS, *Alginat de sodiu 1%, 2%* , *Soluție ¼ strength Ringer +/-* , *Apă distilată*, *Soluție tampon*, CaCl₂ 0,05mMol/l, Seringă, Hârtie de filtru, Agitator magnetic, Instalația de filtrare cu pompă de vacuum). După recoltarea materialului filtrat de pe filtru (porozitate extrem de mică) acesta a fost întins pe o lamă, colorat cu lugol și/sau albastru de metil (tehnicile de laborator folosite în cadrul compartimentului de laborator al Spitalului Clinic de Pediatrie Sibiu). S-au analizat microcapsulele obținute la microscop.

Capitolul 9

Evaluarea factorilor bioactivi imuni din laptele matern și laptele praf

9.1 Introducere

Anumite studii au demonstrat că aceeași chemokină (CCL28) este responsabilă atât de acumularea celulelor producătoare de IgA secretorii la nivelul glandelor mamare cu stimularea secreției de IgA secretorii în laptele matern, cât și de controlul transferului pasiv de IgA secretorii la sugarul alimentat la sân. Alte studii evidențiază existența a două mecanisme care reglează ontogenia IgA circulant la nou-născut și sugar: 1. Mecanismul precoce reprezentat de absorbția intestinală de IgA din laptele matern (în special din colostru, la nivelul căruia concentrația de IgA este mai mare); 2. Mecanismul ulterior este reprezentat de producția endogenă de IgA (ex: intestinală) [44,57].

9.2 Obiective

1. Studiul protecției imune a sugarilor alimentați cu lapte matern comparativ cu cei alimentați cu formule de lapte praf
2. Identificarea factorilor bioactivi din laptele matern și formulele de lapte praf implicate în protecția imună
3. Studiul impactului nivelului IgA din laptele matern și laptele praf asupra imunoglobulinelor (IgA și IgG) din serului sugarilor
4. Studiul impactului nivelului lactozei din laptele matern asupra imunoglobulinelor (IgA și IgG) din serului sugarilor

9.3 Material și metodă

Studiul s-a derulat în cadrul Spitalului Clinic de Pediatrie Sibiu în perioada 2011-2012. S-au recoltat 100 probe de lapte astfel: 52 probe de lapte matern și 48 probe de lapte praf în scopul analizei lor biochimice. S-au recoltat de asemenea 100 probe de sânge de la sugari astfel: 52 probe de sânge de la sugari alimentați cu lapte matern și respectiv 48 de probe de sânge de la sugari alimentați cu același tip de formula de lapte praf în scopul analizei lor biochimice.

Analiza IgA, PCR s-a realizat prin imunoturbidimetrie pe aparatul Hitachi 912, respectiv electroforezele proteinelor pe aparatul Genio S în laboratorul Spitalului Clinic de Pediatrie Sibiu. Mostre din fiecare probă de lapte au fost însămânțate pe medii specifice pentru creșterea lactobacililor. Tulpinile izolate din MRS Agar au fost trecute pe MRS brothulion (aceleași ingrediente fără Agar) și conservate în culturi cu glicerol (-80°C) în congelatoare.

Evaluarea parametrilor fizici și biochimici ai laptelui matern a fost realizată folosind un analizor ultrasonic. Corelațiile Pearson au fost studiate în concordanță cu obiectivele studiului.

9.4.Rezultate

1. În probele de lapte matern conținutul de proteine a fost de 3.45% (media) cu un minim de 3.24% și respectiv un maxim de 3.58% după dozarea pe un analizator cu ultrasunete Ekomilk total. Aceleași probe au fost dozate și pe aparatul de electroforeza Genio S valorile fiind exprimate în g/dl (media a fost de 1.021 g/dl cu un minim de 0.268 și respectiv un maxim de 1.48 g/dl. Practic există o neconcordanță între valorile măsurate și oferite de către analizorul cu ultrasunete și aparatul de electroforeză pentru dozarea de proteine.

2. Conținutul în grăsimi a probelor de lapte a avut o medie de 3.85 g/dl cu un minim de 0.79 g/dl și un maxim de 7.64 g/dl. Dozarea conținutului în grăsimi s-a făcut doar pe analizatorul ultrasonic și este corespunzătoare.

3. Conținutul în lactoză al probelor de lapte a avut o medie de 5.021 g/dl cu un minim de 4.76 g/dl și cu un maxim de 5.25 g/dl. Valorile obținute cu ajutorul analizatorului ultrasonic sunt comparabile cu cele raportate în compoziția laptelui de vacă. (4.5 g/dl până la 5 g/dl).

4. Valorile pH obținute au fost în medie 7.042 cu un minim de 6.8 și un maxim de 7.16. Se remarcă valori scăzute ale pH-ului care împreună cu lactoza favorizează dezvoltarea bacteriilor lactice la nivel intestinal.

5. Valori IgA dozate din probele de lapte matern au prezentat corelații pozitive cu β -globulinele ($p < 0.05$) și nu au prezentat niciun fel de corelații cu lactoza ($p = 0.35 > 0.05$), cu α_1 , α_2 globulinele, cu valorile din serul sugarilor alăptați ale PCR, IgA, IgG.

6. Valorile IgA dozate în probele de lapte praf au prezentat corelații negative cu valorile PCR din serul pacienților și nu au prezentat niciun fel de corelație cu α_2 , β , γ globulinele din laptele praf. Media concentrației IgA din probele de lapte matern a fost mai mare semnificativ statistic (83.71 mg/dl) decât media concentrației IgA din probele de lapte praf (9.45 mg/dl)

7. Nivelele de β -globuline din laptele matern au corelat negativ semnificativ statistic cu nivelele γ -globulinelor și α_1 -globulinelor, ceea ce sugerează practic un rol prioritar în familia globulinelor; γ -globulinele corelează pozitiv cu nivelele IgA și IgG din serul sugarilor.

8. Lactoza se pare că influențează negativ titrul IgA din serul sugarilor (corelații negative semnificative statistic). În formulele de lapte praf nu există corelații semnificative statistic între diferitele fracțiuni globulinice α_2 , β , γ , sau între fracțiunile globulinice și IgA. Există corelații pozitive însă, între titrurile α_2 și PCR din serul sugarilor ceea ce sugerează un rol secundar în protecția antiinfecțioasă.

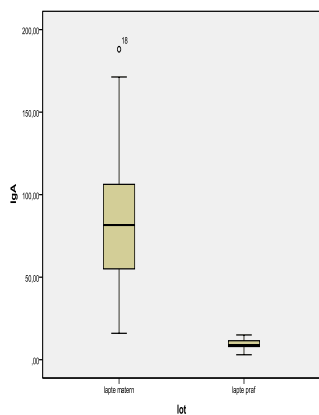


Fig. 9.1- IgA LM vs LP (arhiva personală)

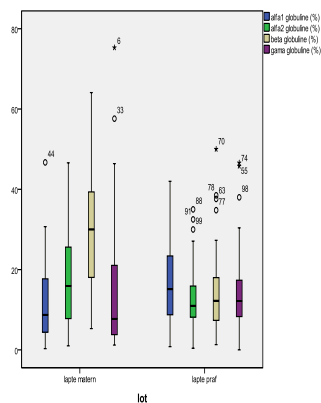


Fig. 9.2- globuline LM vs LP(arhiva personală)

Capitolul 10

Identificarea bacteriană a tulpinilor de *Lactobacillus* ssp.

10.1 Introducere

Izolarea bacteriilor lactice din diferite surse se realizează pe un mediu special MRS (Man Rogosa Sharpe) folosind tehnica plăcii. Izolatele sunt examinate în funcție de morfologia coloniei, reacția catalazei și reacția gram. Bacteriile lactice se colorează gram pozitiv și catalazo-negativ [14,98,102,117]. Identificarea fenotipică presupune pe lângă caracterizarea morfologică (microscopie optică, colorație gram), testul catalazei (negativ) și fermentația zaharurilor (hexozele [14,102,113,117,142]). Fermentarea zaharurilor poate fi pusă în evidență prin testele API-20CH pentru lactobacili [188,189,190] și respectiv API-20CH [20,48,117].

10.2 Obiective:

1. Identificarea tipurilor de tulpini de bacterii lactice izolate din laptele matern
2. Precizarea acurateței de identificare pentru fiecare tulpină prin metoda API CH50
3. Evaluarea oportunității folosirii testelor metabolice de fermentare a zaharurilor ca primă etapă de identificare a probioticelor izolate din laptele matern

10.3. Material și metoda :

Identificarea bacteriană a tulpinilor de *Lactobacillus* ssp. izolate din laptele matern a fost realizată cu ajutorul galeriilor **API 50 CH**. Acestea reprezintă un sistem standardizat, care asociază 50 de teste biochimice, permițând studierea profilului metabolic al hidraților de carbon pentru microorganismele izolate. Galeriele **API 50 CH** sunt utilizate în combinație cu mediul **API 50 CHL**, dedicate pentru identificarea de gen și specie a lactobacililor.

10.3.1 Principiul metodei:

Galeriile **API 50 CH** sunt constituite din 50 microtuburi și fiecare microtub conține un substrat ce aparține familiei hidraților de carbon și derivaților acestora: heterozide, polialcoolii, acizi uronici. Se realizează o suspensie din microorganismele izolate în **mediul API 50 CHL**, se inoculează în fiecare tub al galeriei, rehidratând substratul și se incubează în atmosferă anaerobă. În acest timp fermentația glucidelor se va traduce prin schimbarea culorii în tub, dată de producția de acid și evidențiată prin indicatorul de pH al mediului. Căile oxidative și fermentative determină modificarea culorii determinată de modificarea pH-ului. Inițial culoarea este mov, iar aceasta virează spre galben din pricina formării acizilor în timpul condițiilor de anaerobioză [20,113,189]. O colorație cu nuanță între verde și galben este considerată nesatisfăcătoare [15,20,165,184].

Rezultatele obținute constituie profilul biochimic al tulpinilor bacteriene izolate și permite identificarea lor cu ajutorul unui program informatic dedicat.



Fig 10.1-sinopsis probe lucrate pe kiturile API
(arhiva personală)

10.4. Rezultate

În cadrul studiului au fost identificate prin metoda fermentării zaharurilor 10 tulpini de bacterii lactice cu potențial probiotic și anume: 7 tulpini de *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei*, 1 tulpină de *Lactobacillus fermentum*, 1 tulpină *Lactobacillus acidophilus* ssp *acidophilus*, 1 tulpină de *Lactococcus lactis* ssp *lactis*.

Identificarea celor 7 tulpini heterofermentative *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* din cadrul studiului s-a făcut cu un procent de identificare de 99.8% și un indice T de peste 0.88, peste procentele descrise în literatură.

Identificarea tulpinii de *Lactobacillus fermentum* a fost izolată cu un procent de identificare de 99.8 % și cu un indice T de 0.96, peste valorile descrise în literatură (63 %).

Identificarea tulpinii de *Lactobacillus acidophilus* ssp *acidophilus* s-a făcut cu un procent de 89.6 % cu un indice de identificare T de 0.51 cu o scăzută semnificație taxonomică sub valorile menționate în literatură (peste 93%).

Identificarea tulpinii de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* identificată în studiu s-a realizat cu un indice de identificare sub 50 % nesatisfăcător față de valorile descrise în literatură (84,2 %). Din cele 10 tulpini doar 2 tulpini (*Lactobacillus acidophilus* ssp *acidophilus* și *Lactococcus lactis* ssp *lactis*) au fost identificate cu procente sub valorile descrise în literatură.

Capitolul 11

Creșterea tulpinilor izolate din laptele matern în bioreactor

11.1 Introducere

Procesul multiplicării bacteriilor lactice depinde de calitatea și cantitatea inoculului, concentrația substratului, pH, temperatură, concentrația de oxigen, și cuprinde mai multe faze: 1. faza de latență sau de lag; 2. faza de multiplicare exponențială sau de creștere logaritmică; 3. faza staționară maximală; 4. faza de declin. Pentru fiecare tulpină se determină creșterea densității optice (DO) pe parcursul ciclului de dezvoltare și se reprezintă grafic în funcție de timp. Modelarea proceselor de creștere a bacteriilor lactice în bioreactoare [70, 79,175] se face printr-un model foarte folosit - modelul Monod.

11.2 Obiective

În cadrul cercetărilor referitoare la creșterea tulpinilor izolate din laptele matern în bioreactor am avut ca obiective următoarele: 1.studiul diferențelor de performanță (DO maximă) între diferitele tulpini izolate din probele de lapte matern; 2.studiul combinației optime a parametrilor pH, concentrație de oxigen, temperatură corelat cu valori maxime ale densității optice.

11.3 Material și metoda

Pentru propagarea inițială a bacteriilor , 1 fiola criogenică stocată la -80°C conținând 1 ml s-a folosit pentru inocularea unui pahar Erlenmeyer într-un volum de 50 ml. După inoculare s-a folosit un shaker rotativ la 200 rpm pentru centrifugare apoi s-a realizat incubarea la 37°C pentru 24 ore. Cultivarea în scopul obținerii biomasei s-a realizat în fermentator IKA, Economy 10, capacitate 2l, termostatabil, prevăzut cu 7 porturi pentru introducerea senzorilor , agitator, echipament de prelucrare date cu interfață, senzori de pH, temperatură, oxigen, osciloscop, afișaj digital. Mediul folosit a fost mediul având compoziția în g/dl (Glucoză-25, Extract de drojdie-25, Peptonă-25). Densitatea optică s-a evaluat folosind un spectofotometru la 600 nm după o diluție adecvată. Pentru toate probele mediul cu bullion cultivat a fost diluat pentru a oferi o valoare mai mică de 1 DO_{600} pentru o mai bună acuratețe .

11.4. Rezultate

Valorile cele mai mari privind densitatea optica s-au înregistrat la specia *Lactobacillus paracasei* subspecia *paracasei*. Practic pentru tulpina L_{16} , DO a fost maximă $\text{DO}=1.994$, pentru L_{21} DO a fost de 1.992, pentru L_{18} DO a avut valoarea de 1.987, iar pentru L_{22} DO a fost de 1.972.

Interesant este faptul că pentru restul de 3 tulpini de *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* crescute în bioreactor diferența de maxim pentru DO este notabilă și anume de

1.897 pentru L₁₄, 1.895 pentru L₁₅ la T=ct, pH, oxigen - variabile și respectiv de 1.887 pentru L₆ însă pentru L₆ condițiile au fost diferite în sensul ca parametrii pH și temperatura au fost variabili și concentrația de oxigen constantă.

Tulpina de *Lactococcus Lactis* a atins DO maximă de 1.897 în condiții de temperatură constantă, condiții de pH și concentrație de oxigen variabile, valori comparabile cu tulpinile de *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei*.

Tulpina de *L.acidophilus* ssp *acidophilus*(L₁₂) a atins o DO maximă 1.878 însă totuși cei 3 parametri (pH, temperatură, oxigen) au fost variabili. În cazul tulpinii de *Lactobacillus fermentum* (L₁), DO maximă a avut valoarea cea mai mică comparativ cu celelalte tulpini, 1.779 în condițiile în care totuși cei 3 parametri (pH, temperatură, oxigen) au fost variabili).

Rezultatele noastre privind tulpinile de *Lactobacillus paracasei* subspecia *paracasei* și *Lactobacillus acidophilus* subspecia *acidophilus*, rezultate care vizează condițiile de creștere ale mediului sunt în concordanță cu datele din literatură, aceste tulpini cresc optim la concentrații de glucoză/ fructoză între 10 și 25% [7, 120] și la valori ale pH-ului între 5.5-6.5 respectiv o temperatura de 37°C [43,68,175].

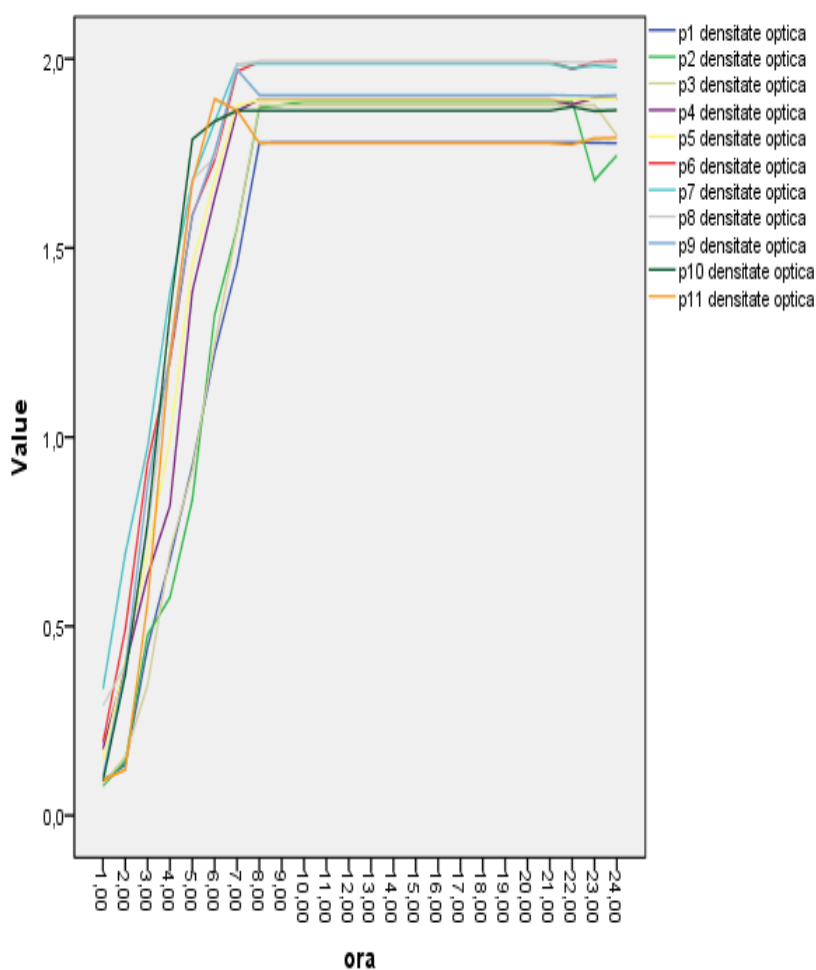


Fig 11.1–sinopsis densitate optica (pentru toate tulpinile)
(arhiva personală)

Capitolul 12

Evaluarea în vitro a tulpinilor bacteriene potențial probiotice

12.1 Introducere

Evaluarea probioticelor potențiale implică evaluarea rezistenței la aciditatea gastrică și toxicitatea bilei, aderarea la țesutul epitelial intestinal, abilitatea de a coloniza tractul gastro-intestinal, producția de substanțe antimicrobiene, precum și capacitatea de a modula răspunsurile imune [10,35,55,56]. Bacteriile probiotice trebuie să supraviețuiască tranzitului prin stomac. Supraviețuirea tulpinilor bacteriene este inițial evaluată prin adăugarea $1-10^{11}$ și $1-10^9$ CFU lactobacili și respectiv, bifidobacterii/L, la mediul MRS modificat cu acid clorhidric până la obținerea pH-ului între 1.5 și 3.4. Evaluarea capacității probioticelor de a rezista la efectele acizilor biliari se realizează pe medii lichide sau solide completate cu bilă bovină, porcină sau umană (obținută prin colecistectomie laparoscopică), completând mediul respectiv cu bilă până la concentrații finale cuprinse între 0,3% și 8 %.

12.2 Obiective

Cercetările referitoare la rezistența tulpinilor izolate din laptele matern au avut ca obiectiv principal studiul rezistenței fiecărei tulpini în mediul cu pepsină, mediul cu bilă și respectiv mediul cu HCl medii care simulează în vitro mediul gastrointestinal

12.3 Material și metodă

Tulpinile de lactobacillus conservate se trec pe mediul MRS agar. Se incubează 48h la 37°C, în atmosferă 10% CO₂. După incubare tulpinile de lactobacillus sunt transferate în cele 3 medii de cultură care simulează sucurile digestive (mediile 1, 2, 3). **Medii de cultură** mediul 1, mediul 2, mediul 3 : **Mediul 1 fără bilă, cu pepsină** g/l (1.glucoza-3,5 ; 2.NaCl-2,05; 3.KH₂PO₄-0,6; 4.CaCl₂-0,11; 5.KCl -0,37; 6.Pepsina- 13,3); **Mediul 2 cu bilă g/l**(1.glucoză -3,5 ; 2.NaCl-2,05; 3.KH₂PO₄-0,6; 4.CaCl₂-0,11; 5.KCl-0,37; 6.Pepsină - 13,3; 7.bilă- 0,05); **Mediul 3 cu HCL** g/l (1.glucoză-3,5; 2.NaCl-2,05; 3.KH₂PO₄-0,6; 4.CaCl₂-0,11; 5.KCl-0,37; 6.Pepsină 13,3; 7.HCL -1M); **Mediu 4 de cultură** pentru obținerea coloniilor bacteriene proaspete **MRS agar**

12.4 Rezultate

1.Tulpina de *L.paracasei* ssp *paracasei* (p₂-L₆) prezintă o creștere de 100% în mediul cu pepsină, o creștere de până la 74.22% la 30' în mediul cu bilă, urmată de o scădere cu 10.3% la 120' și respectiv o scădere de 6.6;

2. Tulpina de *L.paracasei* ssp *paracasei* (p₅-L₁₅) prezintă o creștere de 78.6% în mediul cu pepsină la 120', o scădere de 20.9% în mediul cu bilă la 120' și o scădere de 2.98% în mediul cu HCl;

3. Tulpina de *L.paracasei* ssp *paracasei* (p_6-L_{16}) prezintă o creștere de 81.53% în mediul cu pepsină, o scădere de 14.48% în mediul cu bilă și respectiv o scădere de 12% în mediul cu HCl la momentul 120';

4. Tulpina de *L.paracasei* ssp *paracasei* (p_7-L_{18}) prezintă o creștere de 124% în mediul cu pepsină, o scădere de 20.5% în mediul cu bilă și respectiv o creștere de 1.35% în mediul cu HCl la momentul 120';

5. Tulpina de *L.paracasei* ssp *paracasei* (p_8-L_{21}) prezintă o creștere de 89% în mediul cu pepsină, o scădere de 13.2% în mediul cu bilă și o scădere de 8.6% în mediul cu HCl la momentul 120';

6. Tulpina de *L.paracasei* ssp *paracasei* (p_9-L_{22}) prezintă o creștere de 75.35% în mediul cu pepsină, o scădere de 23.8% în mediul cu bilă și o creștere de 18.3% în mediul cu HCl la momentul 120';

7. Tulpina de *L.acidophilus* ssp *acidophilus* (p_3-L_{12}) prezintă o creștere de 49.15% în mediul cu pepsină, o scădere de 12.9% în mediul cu bilă și respectiv o scădere de 33.67% în mediul HCl la momentul 120';

8. Tulpina de *L.fermentum* (p_1-L_7) prezintă o creștere de 78.8% în mediul cu pepsină, o scădere de 2.75% în mediul cu bilă și respectiv o scădere de 14.1% în mediul cu HCl la momentul 120';

9. Tulpina de *Lactococcus Lactis* ssp *Lactis* (p_4-L_{14}) prezintă o creștere de 35.57% în mediul cu pepsina, o scădere de 3.7% în mediul cu bilă și respectiv o scădere de 3.7% în mediul cu HCl la momentul 120'.

10. Tulpina de *L.paracasei* ssp *paracasei* ($p_{11}-L_8$) prezintă o creștere de 70% în mediul cu pepsină, o scădere de 29.28% în mediul cu bilă și o scădere de 7.17% în mediul cu HCl la momentul 120'; 11. Capacitățile de supraviețuire practic sunt specifice pentru fiecare tulpină).

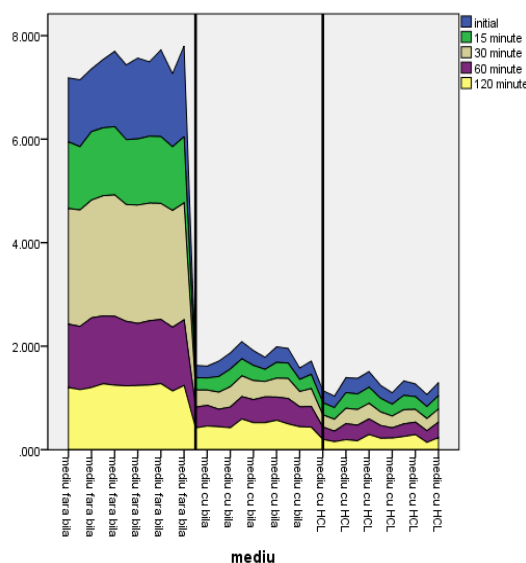


Fig. 12.1 – evoluția densității optice în fiecare mediu, pentru fiecare tulpină)

Capitolul 13

Microîncapsularea tulpinii de *Lactobacillus Paracasei* ssp *Paracasei* (L_{18-p7})

13.1 Introducere

Câteva tehnologii pot fi aplicate în încapsularea probioticelor și fiecare din ele determină microcapsule cu diferite caracteristici în ceea ce privește intervalul de mărimi a particulelor și tipul capsulei. În cazul emulsiei intervalul este cel mai mare, cu valori cuprinse între 0.2 și 5000μm, în timp ce extruzia determină particule peste 300μm până la 5000μm.

13.2 Obiective

1. Analiza mediei diametrelor microcapsulelor obținute prin emulsie (metoda 1) versus media diametrelor microcapsulelor obținute prin extruzie (metoda 2).
2. Analiza influenței concentrației alginatului de sodiu asupra diametrelor microcapsulelor obținute prin extruzie (metodele 3 și 4) și prin corelație cu forma acestora
3. Analiza grosimii peretelui microcapsulelor obținute prin toate cele 4 metode obținute
4. Analiza influenței concentrației alginatului de sodiu asupra grosimii microcapsulelor obținute prin metodele 3 și 4

13.3 Material și metodă

Încapsularea tulpinii de *Lactobacillus Paracasei* ssp *paracasei* (L₁₈) izolată din laptele matern și conservată în culturi cu glicerol (-70°C) în congelatoare s-a realizat în laboratoarele de biochimie și tehnologie farmaceutică din cadrul Facultății de Medicină V.Papilian din Sibiu, prin refacerea culturii în bulion MRS (suspensie bacteriană) care s-a adăugat în substanța încapsulatoare (alginat de sodiu 2%). S-au folosit 4 metode și anume :

metoda 1- emulsionare /gelifiere ionotropica (bullion MRS, *Alginat de sodiu* 2%, *Solutie tampon*, carbonat de calciu 500 mM Ca²⁺ suspensie, *Apă distilată*, CaCl₂ 0,05mMol/l, ulei de floarea soarelui sau alt ulei vegetal, TWEEN 80, Acid acetic 80%

metodele 2,3,4 - Extrudare (Bulion MRS, *Alginat de sodiu* 1%, 2% , *Solutie ¼ strength Ringer +/-* , *Apă distilată*, *Soluție tampon*, CaCl₂ 0,05mMol/l, Seringă, Hârtie de filtru, Agitator magnetic, Instalația de filtrare cu pompă de vacuum).

După recoltarea materialului filtrat de pe filtru (porozitate extrem de mică) acesta a fost întins pe o lamă, colorat cu lugol și/sau albastru de metil (tehnicile de laborator folosite în cadrul compartimentului de laborator al Spitalului Clinic de Pediatrie Sibiu).

S-au analizat microcapsulele obținute la microscopul inversat Zeiss Axiovert 40 folosind software-ul AxiovisionLE-Axiovert 4.8. S-au analizat statistic diametrele, grosimea peretelui și forma microcapsulelor obținute și s-a comparat statistic rezultatele obținute pentru

fiecare metodă (testele T, Mann-Whitney, Kruskal Wallis, Chi-Square, Anova program SPSS).

13.4 Rezultate

Analizând datele prezentate am obținut următoarele rezultate în concordanță cu obiectivele studiului de microîncapsulare:

1. Media diametrelor obținute prin emulsie este mai mică decât media diametrelor obținute prin extruzie doar pentru intervalele 0-99 μm și peste 300 μm în rest pentru intervalele 100-199 μm și 200-299 μm s-au obținut medii mai mari folosind emulsia

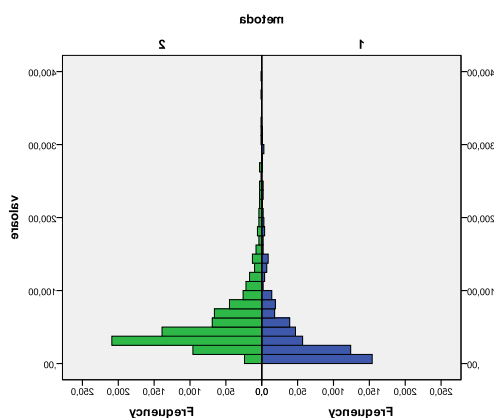


Fig 13.1- emulsie vs extruzie
(arhiva personală)

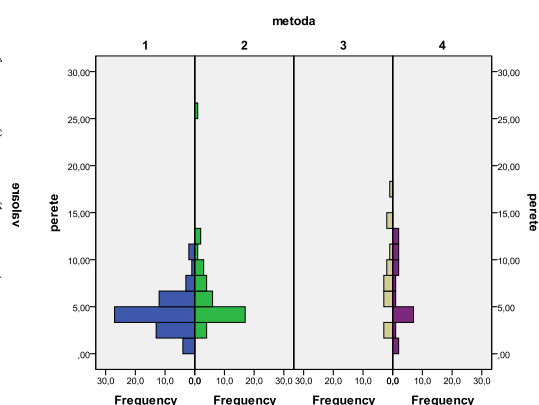


Fig 13.2- grosime perete functie de metodă
(arhiva personală)

2. Creșterea concentrației de alginat de sodiu în cadrul extruziei a determinat creșterea diametrelor indiferent de forma microcapsulelor.

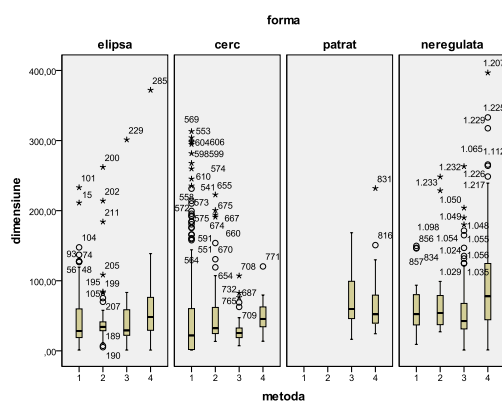


Fig 13.3- grosime dimensiune functie de metodă

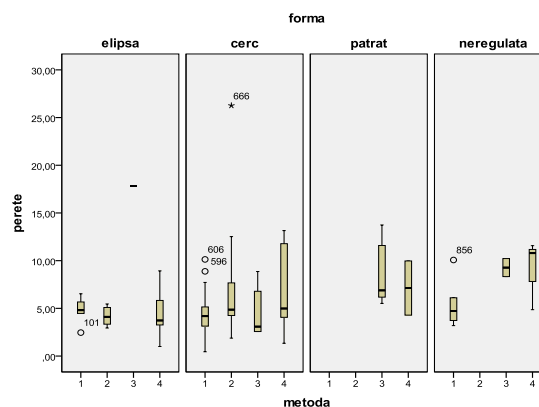


Fig 13.4- grosime perete functie de formă

3. Grosimea peretelui microcapsulei obținute este mai mică prin emulsie decât prin extruzie iar în cazul extruziei depinde de concentrația de alginat și de prezența substanței de întărire.

Capitolul 14

Concluzii

14.1 Concluzii generale

Analiza datelor prezentate sugerează următoarele concluzii în concordanță cu obiectivele studiului referitor la analiza probelor de lapte, identificarea tulpinilor de probiotice izolate din laptele matern, creșterea acestora în bioreactor, analiza privind rezistența la condițiile care simulează mediul gastrointestinal, avantajele unor tipuri de metode încapsulare a tulpinilor izolate funcție de tipul de metodă și de caracteristicile microcapsulelor obținute (diametru, grosime perete):

1. Sugarii cu infecții respiratorii alimentați la sân au o protecție imună superioară față de cei alimentați cu lapte praf prin titrul IgA și al β globulinelor și în secundar prin titrul γ globulinelor.

2. Titrul IgA din laptele matern nu influențează titrurile de IgA și IgG din serul sugarilor iar concentrația de lactoză corelează negativ cu titrul de IgA din serul sugarilor.

3. Identificarea celor 10 tulpini de bacterii lactice prin metoda fermentării zaharurilor (teste API 50 CH) s-a realizat cu procente de peste 99% și indice T de identificare de peste 0.88 pentru 8 tulpini (7 tulpini-Lactobacillus Paracasei ssp paracasei și 1 tulpina de Lactobacillus fermentum).

4. Identificarea celor 10 tulpini de bacterii lactice prin metoda fermentării zaharurilor (teste API 50 CH) s-a realizat pentru restul de 2 tulpini (L. Acidophilus ssp Acidophilus, Lactococcus Lactis ssp Lactis) la un procent de sub 90% ceea ce presupune totuși o semnificație mai scăzută taxonomică pentru aceste subspecii;

5. Metoda fermentării zaharurilor (teste API 50 CH) se poate folosi ca primă etapă de identificare.

6. Creșterea în bioreactor a prezentat cele mai mari valori ale densității optice la specia Lactobacillus paracasei subspecia paracasei, tulpinile L₁₆, L₁₈, L₁₄ (1.994, 1.992, 1.987) și pentru Lactococcus Lactis ssp lactis L₁₄(1.897) în aceleași condiții de mediu (temperatura constantă, pH-variabil, oxigen variabil), minimul de densitate optică fiind înregistrat în cazul Lactobacillus fermentum L₁(1.779) în condiții de pH, temperatură, oxigen variabile.

7. Toate tulpinile prezintă o creștere a valorilor densității optice de peste 35 % după 2 ore de expunere la mediul cu pepsină respectiv o scădere a valorilor densității optice de peste 2.75% după 2 ore de expunere la mediul cu bilă.

8. Majoritatea tulpinilor prezintă o scădere a valorilor densității optice în mediul cu acid HCl de peste 2.98%, cu excepția tulpinilor L.Paracasei ssp paracasei (L₂₁, L₂₂) care prezintă o ușoară creștere.

9. Media diametrelor obținute prin emulsie este mai mică decât media diametrelor obținute prin extruzie doar pentru intervalele 0-99 μm și peste 300 μm în rest pentru intervalele 100-199 μm și 200-299 μm s-au obținut medii mai mari folosind emulsia.

10. Creșterea concentrației de alginat de sodiu în cadrul extruziei a determinat creșterea diametrelor indiferent de forma microcapsulelor obținută dar și scăderea grosimii peretelui microcapsular.

11. Grosimea peretelui microcapsulei este mai mică prin emulsie decât prin extruzie.

14.2 Recomandări

Proiectele de cercetare similare de analiză lapte, izolare, identificare, testare rezistența în vitro, creștere în bioreactoare pentru probioticele izolate din laptele matern ar trebui să țină cont de următoarele aspecte:

1. Sunt necesare studii suplimentare de analiză a laptelui matern pe cohorte de sugari alimentați natural în vederea validării dinamicii IgA și β -globuline versus γ -globuline la sugarii cu infecții respiratorii.
2. Este de dorit ca identificarea tulpinilor de lactobacilli și bifidobacterii să se verifice și prin identificare genomică (PCR RFLP, secvențiere genetică) având în vedere faptul că au fost semnalate confuzii în ceea ce privește caracterizarea taxonomică a unor tulpini.
3. Fermentarea carbohidraților prin metoda testelor API se recomandă ca prima etapă pentru identificarea genului.
4. Pentru bacteriile lactice izolate din laptele matern din specia *Lactobacillus paracasei* condițiile optime de creștere în bioreactor presupun menținerea constantă a temperaturii cu valori ale pH-ului și a concentrației de oxigen variabile.
5. Designul studiilor ulterioare pentru tulpinile de probiotice izolate din laptele matern trebuie să includă atât cercetări pe medii individualizate (exemplu doar cu pepsină, doar cu bilă sau doar cu acid clorhidric) dar și pe medii care combină toate cele 3 componente (pepsină, bilă, acid clorhidric).
6. Studiile ulterioare trebuie să vizeze și testarea bacteriilor lactice neîncapsulate versus bacterii lactice încapsulate în mediile prezentate, pentru fiecare tulpină în parte.

14.3 Contribuții proprii și tendințe viitoare de dezvoltare a cercetării

În cadrul cercetărilor efectuate s-au evidențiat mai multe elemente de originalitate care definesc practic contribuțiile personale:

1. În ceea ce privește evaluarea factorilor bioactivi imuni din laptele matern și laptele praf menționăm folosirea cu succes a imunoturbidimetriei pentru analiza serului obținut după îndepărtarea supernatantului din probele de lapte matern și probele de lapte praf. În cadrul Spitalului Clinic de Pediatrie Sibiu metoda era folosită doar pentru analiza serului obținut din sângele pacienților însă s-a dovedit fezabilă și pentru analiza serului din produsele lactate.

2. Trebuie să remarcăm faptul că analiza proprietăților fizico-chimice ale laptelui matern s-a realizat cu succes pentru dozarea grăsimilor și a pH-ului pe analizorul ultrasonic în laboratorul de testare a siguranței alimentare din cadrul Facultății de Științe Agricole Industrie Alimentară și Protecția Mediului.

3. Ca și rezultate deosebite precizăm documentarea protecției imune a sugarilor realizată în principal prin titrul IgA și al β -globulinelor și în secundar prin titrul γ -globulinelor fără ca titrul de IgA să influențeze IgA și IgG din serul sugarilor .

4. Identificarea cu procente peste cele descrise în literatura de specialitate a 7 tulpini din specia *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* și a unei tulpini de *Lactobacillus fermentum*, ceea ce recomandă fiabilitatea metodei de fermentare a zaharurilor pentru aceste 2 subspecii.

5. Prezentarea diferențelor de performanță vizând creșterea în bioreactor pentru mai multe tulpini izolate din laptele matern aparținând speciei *Lactobacillus paracasei* subspecia *paracasei* în aceleași condiții de mediu (temperatură constantă, pH-variabil, oxigen variabil).

6. Identificarea a cel puțin 2 tulpini aparținând speciei *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* care prezintă creșteri la 120 minute de la expunerea în mediul cu HCL precum și capacitatea de rezistență crescută în mediul cu bilă a speciei *Lactobacillus fermentum* și a speciei *Lactococcus Lactis* ssp *lactis*.

7. Realizarea a 1299 măsuratori pe lame (519 măsuratori microcapsule obținute prin emulsie versus 780 microcapsule obținute prin extruzie) de aproape 13 ori mai mult decât minimul de 100 de măsuratori aleatori recomandate în literatura de specialitate.

8. Documentarea influenței concentrației alginatului de sodiu și a prezenței substanței de întărire asupra grosimii peretelui microcapsular.

9. Folosirea unor filtre mai mici de 40 μ m prin care am demonstrat practic că distribuția majorității diametrelor microcapsulelor obținute atât prin emulsie cât și prin extruzie se realizează în intervalul 0-99 μ m.

10. Obținerea unui produs finit cu *valoare nutraceutică* și anume încapsularea unei tulpini de *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* de proveniență umană în microcapsulele de alginat de sodiu 1-2% .

Direcțiile viitoare de dezvoltare ale acestei cercetări conturează următoarele aspecte:

1. Posibilitatea realizării la scară industrială a procesului de încapsulare a tulpinii obținute
2. Posibilitatea de fermentare a laptelui sau adăugarea de tulpini încapsulate în produsele derivate din lapte (iaurt, branză)

Bibliografie

1. Abd-Elhamid A.M., Production of Functional Kariesh Cheese by Microencapsulation of Bifidobacterium adolescentis ATCC 115704, *Advance Journal of Food Science and Technology* 4(2) : 112-117, 2012, ISSN : 2042-4876;
2. Abd Malek Roslinda, Production of Lactobacillus salivarius, a new probiotic strain isolated from human breast milk, in semi-industrial scale and studies on its functional characterization; *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, A.Mendez-Vilas (Ed), pp 1196-1204, ISBN 978-84-614-6195-0 FORMATEX 2010;
3. Adhikari K., Mustapha A., Grun I.U., L.Fernando, Viability of microencapsulated Bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage, *Journal of Dairy Science*.83 (2000) 1946-1951; ISSN:0022-0302;
4. Agrawal Renu, Probiotic: an emerging food supplement with health benefits. *Food Biotechnology*, pp 227-246, vol 19, number 2, 2005; ISSN: 0890-5436 print DOI: 10.1080/08905430500316474;
5. Akhilar Mohammed,. Enhancement of probiotics survival by microencapsulation with alginate and prebiotics. *MMG 445 Electronic Journal of Biotechnology*(6):13-18. 1; 2010
6. Albertini [Beatrice](#), Passerini [Nadia](#), Di Sabatino [Marcello](#), Vitali [Beatrice](#), Brigidi [Patrizia](#), Rodriguez [Lorenzo](#), Polymerlipid based mucoadhesive microspheres prepared by spray-congealing for the vaginal delivery of econazole nitrate, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Dec 25, pp 591-601, (2008) ISSN [0928-0987](#) ;
7. Ali El-Enshasy et al., Optimization of cell mass production of the probiotic strain lactococcus lactis in batch and fed-batch culture in pilot scale levels; *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. FORMATEX, Spain, pp. 873-879. ISBN 978-84-614-6195-0, 2010;
8. Allan-Wojtas P., Hansen Truelstrup L. and Paulson A.T., Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation, *LWT Food Science and Technology Journal*. 41, 101-108 (2008) ISSN: 0023-6438.;
9. Ambule A.H., Timande S.P and Soni S.B., Study on Probiotic Potential and Laboratory Scale Production of Lactic Acid Bacteria; *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*; volume 3, Issue 3, pp 295-300, July–Sept 2012, ISSN:0976-4550; [doi:10.2298/CICEQ0703169P](http://www.ijab.pt.com/) ;
<http://www.ijab.pt.com/>;
10. Anal Anil Kumar and Singh Harjinder. Recent advances in microencapsulation of probiotic for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 240-251, 18, 2007 DOI:10.1016/j.tifs.2007.01.004;
11. Anin Tawheed, Thakur Manika, Jain S.C. - Microencapsulation - The future of Probiotic Cultures, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2013: 3(1), pp 35-43 ISSN; ISSN: 1338-5178;
12. Annan NT, Borza AD, Hansen L.-Truelstrup. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic Bifidobacterium adolescentis 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, 2008, 41:184-193 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2007.11.001> ; ISSN: 0963-9969;
13. Arsh Chanana, Mahesh Kumar Kateria, Manish Sharma, Ajay Bilandi, Seth C.L. Bihani S.D, Microencapsulation : Advancements in Applications, *International Research Journal of Pharmacy IRJP*, 4(2), ISSN: 2230-8407; www.irjponline.com, 2013;
14. Arup Nag, Development of microencapsulation technique for probiotic bacteria Lactobacillus casei 431 usig a protein polysaccharide complex" A Thesis Presented in Partial Fulfilment of the Requirements for the Degree of Masters of Technology in Food Technology at Massey University, Palmerston North, New Zealand; 2011 , <http://hdl.handle.net/10179/2355>;
15. Ashraf M. et al, In Vitro Screening of Locally Isolated Lactobacillus Species for Probiotic Properties; *Pakistan Veterinary Journal*. 2009, 29(4):186-190; 2009;
16. Avallone Bueno Luciano, Fonseca Maria de Fatima, Marques Djalma, Shinagawa Fernanda Branco, Quintino Amanda, Locatelli Gabriel, Qudros Cedemir Peseira Evaluation of probiotic containing microcapsules stability in different media www.icef11.org/main.php/fall paper, 2011, full paper pceedings, ISBN:978-960-89789-3-5;

17. Ballard Olivia et. Al, Human Milk Composition Nutrients and Bioactive Factors, *Pediatric Clinics of North America* 60 (2013) 49–74; DOI: 10.1016/j.pcl.2012.10.002 ; www.pediatric.theclinics.com ;
18. Bhatena Jasmine, Tamaro-Duchesnean Catherine, Martoni Cristopher, Malhotva Meenakshi, Kulamarva Arun, Urbanska Malgarzata Aleksandra, Arghya Paul and Prakash Satya, Effect of Orally Administered Microencapsulated FA - Producing *L. fermentum* on Markers of Metabolic Syndrome: An In Vivo Analysis; *Journal of Diabetes & Metabolism* 2012, S6 , ISSN: 2155-6156, pp 1-9;
19. Bickerstaff Gordon F., Immobilization of Enzymes and Cells, *Methods in Biotechnology*, 1st ed. Bickerstaff GF Eds., Humana Press, Totowa, USA, 1997, vol 1, ISBN 0-896-03386-4;
20. Blazenka Kos et al, Characterization of the Three Selected Probiotic Strains for the Application in Food Industry, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2008) 24(5):699-707, DOI 10.1007/s11274-007-9528-y, 2008;
21. Bogner Agnes, Jouneau PH, Thollet G, Basset D, Gauthier C. A history of scanning electron microscopy developments: Towards "wet-STEM" imaging. *Micron Journal* 2007; 38:390-401; ISSN 09684328;
22. Bos GW; Verrijck R; Franssen O; Bezemer JM; Hennink WE; Crommelin DJ. Hydrogels for the Controlled Release of Pharmaceutical Proteins, *Pharmaceutical Technology North America*, 2001, 25(10), 110-120; ISSN:1534-2131
23. Both Emese, Gyenge Laszlo, Bodar Zsolt, Gyorgy Eva, Lanyi Szabdc, Abraham Beata, Intensification of probiotic microorganisms viability by microencapsulation using ultrasonic atomizer U.P.B. *Scientific Bulletin, series B*, vol 74, Issue 1, 2012, ISSN 1454-2331;
24. Bouguettoucha, A. ; Balannec, B. ; Nacef, S. ; Amrane, A.; Unstructured Models for Batch Cultures of *Lactobacillus Helveticus*; *Associazione Italiana di Ingegneria Chimicã, CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS ; VOL 14 2008; 14; 121-128*, International conference on industrial biotechnology; IBIC2008,, www.aidic.it/IBIC2008/webpapers/;
25. Bryony James, Fonseca Celia. Textures studies and compression behavior of apple flesh. *International Journal of Modern Physics*. 2006; 20:3993-3998; ISSN: 0217-9792;
26. Burgain J. , Gaiani C., Francius G., Rend-Juelles A.M., Cailliez-Grimal C., Lebeer S., Tytgat H.L.P., Vanderleyden J., In vitro interactions between probiotic bacteria and milk proteins probed by atomic force microscopy, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Journal* (2013) pp 153-162, ISSN: 09227-7765
27. Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher J., Encapsulation of probiotic living cells : From laboratory scale to industrial applications, *Journal of Food Engineering* 104 , Issue 4, June (2011) 467-483 ; DOI : 10.1016/j.foodeng.2010.12.031; ISSN:0260-8774; 2011;
28. Capela P, Hay TKC, Shah NP. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt, *Food Research International* 39, issue 2, (2006) 203-211- " "; ISSN 0963-9969; DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2005.07.007>;
29. Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnology Letters* 2002; 24:1587-1591; ISSN: 1573-6776
30. Champagne CP, Starter cultures biotechnology: the production of concentrated lactic cultures in alginate beads and their applications in the nutraceutical and food industries. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 2006; 12:11-17. [doi: 10.2298/CICEQ0601011C]; ISSN 1451-9372;
31. Champagne, CP. Fustier, Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology* 2007; 18:184-190. [doi: 10.1016/j.copbio.2007.03.001] [pmid: 17368017]; ISSN 09581669;
32. Chan LW, Jin Y, Heng PWS. Cross-linking mechanisms of calcium and zinc in production of alginate microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 242:255-258; ISSN:0378-5173;
33. Chan LW, Lee HY, Heng PWS. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 63:176-187; ISSN, 0144-8617 ;
34. Chan LW, Lee HY, Heng PWS. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 242:259-262; ISSN: 0378-5173;

35. Chandramouli, V.; Kailsapathy, K.; Peiris, P.; Jones, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods* 2004, 56, 27-35; ISSN 0167-7012;
36. Charalampopoulos Dimitris, Rastall Robert A. (Eds) *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, Springer Science and Business, LLC 2009, ISBN:978-0-387-79057-2;
37. Chavarri Maria, Izaskun Marañón and María Carmen Villarán, *Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria*, ISBN 978-953-51-0776-7, Published: October 3, 2012 ; DOI: 10.5772/50046;
38. Chavarri Maria, Maranen Izaskun, Ares Raquel, Ibanez Francisco C, Marzo Florencia, Villaran Maria del Carmen *Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. International Journal of Food Microbiology* 142(2010) pp 185-189, ISSN: 0168-1605, doi: 10.1016/j.ijfood.micro 2010.06.022;
39. Chen G, Yao SJ, Guan Yx, Lin DQ. Preparation and characterization of NaCS-CMC/PDMDAAC capsules. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 2005; 45:136-43; ISSN: 0927-7765;
40. Chen, K.N., Chen M.J., Liu, J.-R., Lin, C.W. and Chiu, H.Y. (2005), Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. *Journal of Food Science*, 70: M260–M266. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb09981.x; ISSN0022-1147;
41. Chen M.; Mustapha, A. Survival of freeze-dried microcapsules of α -galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. *Food Microbiology*, 2012; 30:68-73; ISSN 07400020;
42. Chicea D, **Neamțu B** , Chicea R., Chicea L. M. , The Application of AFM for Biological Samples Imaging , *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, Vol. 5, No 3, July - September 2010, p. 1033 - 1040;ISSN 1842 - 3582
43. ChinFa Hwang et all, Biomass Production of *Lactobacillus Plantarum* LP02 Isolated from Infant Feces with Potential Cholesterol-Lowering Ability; *African Journal of Biotechnology* vol 10(36), pp7010-7020, 18 July 2011; DOI : 10.5897/AJB11.507, ISSN 1684-5315, 2011;
44. Chirico G., Gasparoni A., Immunologic components of human milk, *Haematologica Reports* 2006; 2 (issue 10):27-30; September 2006; ISSN: 1824-9337
45. Chirico Gaetano, Marzollo Roberto, Cortinovis Sheila, Fonte Chiara, Gasparoni Antonella, Antiinfective properties of Human Milk, *The Journal of Nutrition*, 138: 1801S-1806S, 2008, ISSN : 0022-3166/08;
46. Cinquin C., Le Blay G., Fliss I., Lacroix C., Immobilization of Infant Fecal Microbiota and Utilization in an in vitro Colonic Fermentation Mode, *Microbial Ecology* 48 (2004) 128-138. ISSN 0095-3628;
47. Corcoran B.M., Ross R.P., Fitzgerald G.F. and Stanton C., Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances, *Journal of Applied Microbiology* 96, 1024-1039 (2004); ISSN, 1364-5072;
48. Çakmakçı S. et al, Probiotic Properties, Sensory Qualities and Storage Stability of Probiotic Banana Yogurts; *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* 2012; 36(3):231-237;DOI:10.3906/vet-1007-2; 2012;
49. Darrabie Marcus D, Kendall William FJ, Opara Emmanuel C. Characteristics of poly-L-ornithine-coated alginate microcapsules. *Biomaterials* 2005; 26:6846-52; ISSN: 0142-9612;
50. De Castro M, Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, Pedraz JL. Comparative study of microcapsules elaborated with three polycations (PLL, PDL, PLO) for cell immobilization. *Journal of Microencapsulation* 2005; 22:303-15; ISSN: 0265-2048;
51. Desai K.G.H., Park H.J., Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres, *Journal of Microencapsulation*: 22(4), June, p 377-395 (19), 2005 ISSN 1464-5246;
52. Desmond C, Santon C, Fitzgerald GF, Collins K, Ross RP. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal* 2001; 11:801-808; ISSN 0958-6946;
53. Devi Nirmala, Kakati Dilip Kumar - Smart porous microcapsles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex, *Journal of Food Engineering*, 2013 117: pp 193-204, ISSN: 0260-8774;
54. Doleys Y.; Fliss I.; Lacroix C. Quantitative determination of the spatial distribution of pure and mixed-strain immobilized cells in gels beads by immunofluorescence. *Applied Microbiology Biotechnology* 2002, 59, 297-302; ISSN 1432-0614;

55. Dong Z., Wang Q, Du Y - Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. *Journal of Applied Membrane Science*, 2006, 280:37-44; ISSN 0376-7388;
56. Draget, K.I.; Steinsvag, K.; Onsoyen, E.; Smidsrod, O. Na⁺ and K⁺ - Alginate effect on Ca²⁺ gelation. *Carbohydrate Polymers* 1998, 35, 1-6; ISSN 01266039;
57. Ekah Elijah Ella et al. , Studies on the Interaction between IgA, lactoferrin and lysozyme in the breastmilk of lactating women with sick and healthy babies; *Journal of Infectious Diseases and Immunity*, vol 3(2), pp 24-29, 2011 ISSN 2141-2375;
58. Eun Y. Ann, Younghoon Kim, Sejong Oh, Jee-Young Imm , Dong-Jun Park , Kyoung S. Han, Sae H. Kim, Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system, *International Journal Food Science Technology* 2007;vol 42, issue4, pp:411-419. [doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01236.x] ISSN 0950-5423;
59. Eun Young Lee, Effect of Atomization on viability of microencapsulated probiotics, Master Thesis, pp 1-73, 2012, <https://www.ideals.illinois.edu> ;
60. Fahimdnes Maryam et al, " Effect of microencapsulation plus resistant starch on survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* in mayonnaise sauce " *African Journal of Microbiology Research* vol 6(40), pp 6853-6858, oct 2012; ISSN 1996-08008;
61. Fatemeh Atyabi Saeed; Manoochehri Shadi, Moghadam Rassoul, Dinarvand. Cross-linked starch microspheres: Effect of cross-linking condition on the microsphere characteristics *Archives of Pharmacal Research*, 2006, 29(12), 1179-1786;
62. Farzanch Lotfipour, Shahla Mirzaeei, Maryam Maghsoodi, Evaluation of the effects of CaCl₂ and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis, *Advances Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 2(1), 71-78 doi: 105681/apb.2012.010; ISSN 2228-5881;
63. Fazaeli M., Tahmaebi M. and Emam Z., Characterization of food texture: application of Microscopic technology, *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology*, ISBN(13): 978-84-939843-6-6 (pp 855-871), 2012;
64. Garofalo Roberto, Cytokines in Human Milk, *The Journal of Pediatrics*. www.jpeds.com, supplement, 2010, 156:S36-40;ISSN 00223476;
65. Galia Salem, Zaiton Hassan and Maryam Abubako , Adhesion of Probiotic Bacteria to Resistant Rice Search, *American Journal of Applied Sciences* 10(4): pp 313-321, ISSN: 1546-9239;
66. Gbassi K Gildos., Vandamme Thierry, Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut, 4, 149-163; 2012;
67. Gbassi, G K.; Vandamme, T.; Ennahar, S.; Marchioni, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, 129, 103-105; ISSN 0168-1605 ;
68. Georgieva R., Koleva P. , Nikolova D., Yankov D. and Danova S., Growth parameters of Probiotic Strain *Lactobacillus Plantarum* Isolated from Traditional White Cheese ; *Biotechnology&Biotechnology Equipment* 23/2009/SE; ISSN 1310-2818 ; 2009;
69. Gharsalaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R., Application of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International Journal*, 2007, 40:1107-1121; doi:10.1016/j.foodres.2007.07.004;
70. Ghosh M. ; Ghosh U. ; Comparative Batch Growth Studies of Pure *Lactobacillus* Strains and Their Co-culture in Synthetic Medium with Different Neutralizing Agents; *Associazione Italiana di Ingegneria Chimica; CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS* ; VOL 14 2008; 14; 221-228 International conference on industrial biotechnology; IBIC2008; www.aidic.it/IBIC2008/webpapers;
71. Goodwin J.T., Somerville G.R., Microencapsulation by physical methods; *Chemtech* 4: 623-626,(1974);
72. Gorecka Elzbiela, Jostuzebska Magdalena; Immobilization techniques and biopolymer carriers, *Biotechnology and Food Science* 2011(1), 65-86, ISSN: 2084-0136;
73. Gouin Sebastien. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*. 2004, 15, 330-347; ISSN 0924-2244;

74. Govind Babu, Shantanu Rath, V.Nithyalakshmi, Probiotic Viability of Freeze Dried Synbiotic Microcapsules in Skim Milk Powder at Ambient Storage Condition 2011, Internet Journal of Food Safety; vol 13.2011, pp 62-68;
75. Grasdalen H., Larsen B., Smidsrod O. A P.M.R. study of the composition and sequence of uronate residues in alginates. Carbohydrate Research 1979: 23-31; DOI: [10.1016/S0008-6215\(00\)84051-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84051-3);
76. Grasdalen H. High-field, H-NMR spectroscopy of alginate: sequential study and linkage conformation. Carbohydrate Research 1983:225-60;
77. Grasdalen H., Larsen B., Smidsrod O. ¹³C-NMR studies of monomeric composition and sequence in alginate. Carbohydr Res 2008:179-91; [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)85243-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85243-X) ;
78. Guilbert T.W et al, Effect of Breastfeeding on Lung Function in Childhood and Modulation by Maternal Asthma and Atopy; American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Vol 176, pp 843-848, 2007, DOI:10.1164/rccm.200610-1507OC;
79. Gurjot Deepika et al, Influence of Fermentation Conditions on the Surface Properties and Adhesion of Lactobacillus Rhamnosus GG;. Microbial Cell Factories; 2012, 11:116; DOI : 10.1186/1475-2859-11-116;
80. Hamayoumi Aziz, Ehsami Mohammed Reza, Ayizi Aslan, Yarmand Mohammad Laeid, Razani Hadi S., Effect of Lecithin and Calcium Chloride Solution on the Microencapsulation Process Yield of Calcium Alginate Beads, Iranian Polymer Journal 16(9), 2007, pp 597-606, ISSN: 1735-5265;
81. Homayouni Aziz et al, Spectrophotometrically Evaluation of Probiotic Growth in Liquid Media;Asian Journal of Chemistry, vol 20, No 3 (2008) pp 2414-2421; www.asianjournalofchemistry.co ; 2008;
82. Harnsilawat, T.; Pongsawatmanit, R.; McClements, D.J. Characterization of β -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. Food Hydrocolloids 2006, 20, 577-585; ISSN 0268005X;
83. Harker FR, White A, Gunson FA, Hallett IC, De-Silva HN. Instrumental measurement of apple texture: a comparison of the single-edge notched bend test and the penetrometer. Post-harvest Biology and Technology. 2006; 39:185-192; ISSN, 0925-5214;
84. Heinzen Christoph, Marison I., Berger A. and U. von Stockar. Use of vibration technology for jet break-up for encapsulation of cells and liquids in monodisperse microcapsules. Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology(Focus on Biotechnology) Volume 8A, 2004, pp 257-275; ISSN: 1569-268X; DOI :10.1007/978-94-017-1638-3_14;
85. Herbel Stefan R et al , Timely Approaches to Identify Probiotic Species of the Genus Lactobacillus, Gut Pathogens 2013; 5:27; DOI:10.1186/1757-4749-5-27; 2013-Review;
86. Honorio-França Adenilda Cristina and Luzia-França Eduardo, Human Milk: An Ecologically Functional Food; Environmental Sciences “Relevant Perspectives in Global Environmental Change” chapter 4, ISBN 978-953-307-709-3 DOI:10.5772/26520, 2011 December;
87. Huguet, M.L., Neufeld R.J., Dellacherie E. - Calcium-alginate beads coated with polycationic polymers: Comparison of chitosan and DEAE-Dextran. Process Biochemistry. 1996, 31, 347-353 ISSN:. 0032-9592;
88. Hyun-jue Kim et al, Characterization of Lactic Bacterial Strains Isolated from Raw Milk; Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 2006, vol 19, No1; 131-136; 2006;
89. Illum L.; Fisher AN; Jabbal-Gill I.; Davis SS, Bioadhesive starch microspheres and absorption enhancing agents act synergistically to enhance the nasal absorption of polypeptides, International Journal of Pharmaceutics, 2001, 222(1), 109-119;; ISSN: 0378-5173;
90. Jackson, LS. and K. Lee, Microencapsulation and the food industry , Lebensmittel-Wissenschaft Technologie 1991, vol. 24, no4, pp. 289-297 ; ISSN [0023-6438](https://doi.org/10.1002/9783527300000) ;
91. Jafari SM; Assdpoor E; Bhandari B.; ; Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying ,Y. He. Food Research International, 2008, 41(2), 172-183;2008, ISSN, 0963-9969;
92. Jayalalitha V , Balasundaram B and R, Palanidakai, In vitro Assessment of microencapsulated probiotic beads, International Journal of Agriculture : Research and Review vol 2(1), 1-6, 2012, ISSN: 2228-7973;
93. Junzhang Lin, Weiting Yu, Xindong Liu, Hanggno Xie, Wei Wang and Xxaajun Ma - In Vitro and in Vivo characterization of alginate-chitosan-alginate artificial microcapsules for therapeutic oral delivery of live bacterial cells; Journal of Bioscience and Bioengineering 2008 Jun;105(6):660-5. doi: 10.1263/jbb.105.660;

94. Jurcoane Stefana, Sasarman Elena, Lupescu Irina, Rosu Ana, Banu Alexandra; Berehoiu Tamba Radiana, Radoi Florentina, *Tratat de Biotehnologie vol I si II* , Editura Tehnica Bucuresti, ISBN: 973-31-2236-X, 973-31-2235-1, 2004;
95. Jyothi Sri.S et al , Microencapsulation, A Review, *International Journal of Pharma & Bio Sciences*;Jan-Mar2012, Vol. 3 Issue 1, pP.509, ISSN 0975-6299 (www.ijpbs.net);
96. Kailasapathy K.,*Microencapsulation of probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications*"; *Current Issues in Intestinal Microbiology*. (2002) 3: 39-48; 2002, Horizon Scientific Press; PMID: 12400637;
97. Kailasapathy, K., *Encapsulation technologies for functional food and nutraceutical product development*. CAB Reviews perspectives in agriculture veterinary science nutrition and natural resources 2009 Vol. 4 No. 033 pp. 1-19; ISSN 1749-8848;
98. Karna B.K.L. et al, *Lactic Acid and Probiotic Bacteria from Fermented and Probiotic Dairy Products* ; *Science Diliman* (July – December 2007) 19:2, 23-24, ISSN 0115-7809; 2007;
99. Khalil Rowaida et al., *Evaluation of the Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Faeces of Breast – Fed Infants in Egypt*; *African Journal of Biotechnology* vol 6 (7), pp 939-949 April 2007, ISSN: 1684-5315; 2007;
100. Khasravi Zenjani Mohammad Ali et al *Microencapsulation of Lactobacillus casei with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cromfilled cake*, *African Journal of Microbiology Research*, vol 6(26) pp 5511-5517, ISSN 1996-0808;
101. Ki.Yong Lec et al, 2000; *Survival of Bifidobacterium longum immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution*; *Applied and Environmental Microbiology*, Feb 2000, p 869-873, ISSN: 0099-2240;
102. Kizerwetter-Swida Magdalena and Binek Marian; *Selection of Potentially Probiotic Lactobacillus Strains Towards their Inhibitory Activity against Poultry Enteropathogenic Bacteria* *Polish Journal of Microbiology* 2005, vol 54, No4, 287-294; ISSN 1733-1331;
103. Klien J., Stock J., Vorlop K.D.. *Pore size and properties of spherical calcium alginate biocatalysts*, *European Journal Applied Microbiology Biotechnology*, 18, 86-91; 1983, ISSN: 1432-0614;
104. Kotikalapudi Lakshmi B. - *Characterization and encapsulation of probiotic bacteria using a Pea - protein Alginate matrix*, A Thesis Submitted to the College of Graduate Studies and Research in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in the Department of Food and Bioproduct Sciences University of Saskatchewan Saskatoon, Saskatchewan, Canada , July 2009; <http://hdl.handle.net/10388/etd-08282009-170854> ;
105. Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H. - *Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt*, *International Dairy Journal*, 13 (2003) 3-13. ISSN 0958-6946;
106. Krasaekoopt, W.; Bhandari, B.; Deeth, H. *The influence of coating on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria*. *International Dairy Journal* 2004, 14, 737-743; ISSN 0958-6946;
107. Krishnan; R. Bhosale; RS Singhal. *Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials*; *Carbohydrate Polymers*, 2005, 61(1), 95-102, ISSN, 0144-8617;
108. Lachman Leon, Lieberman Herbert A., Kanig Joseph L., *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, 3rd edition, pp.420;
109. Lee J.S., Cha D.S., Park H.J., *Survival of freeze-dried Lactobacillus bulgaricus KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microcapsles*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(2004) 7300-7305; ISSN 0021-8561;
110. Lee MJ, Scog EJ, Lee JH. *Physicochemical properties of Chaga (Inonotus obliquus) mushroom powder as influenced by drying methods*. *Food Science and Nutrition*, 2007; 12:40-45; ISSN, 1226-332X;
111. Leuschner R. , Kneife W., Vernoux J.-P. , Stanton C. and Aldamiz P. *Methods for the official control of probiotics used as food additives*, volume 2, *European Comission Community Research* 2002, ISBN 92-894-6251-5;
112. Lisova Ivana, Horackova Sarka, Kovacova Renata, Kaeda Voitech and Plackova Milada *Emulsion Encapsulation of Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB12 with the addition of Lecithin* - *Czech Journal of Food Sciences*, vol 31, 2013, No 3: pp 270-274, ISSN 1805-9317;

113. Lukacova Drahomira et al, In Vitro Testing of Selected Probiotic Characteristics of Lactobacillus Plantarum and Bifidobacterium Longum , Journal of Food and Nutrition Research, vol 45, 2006, No 2, pp 77-83, ISSN:1336-8672 2006;
114. M. Lawrence Robert, A. Pane Camille, Human Breast Milk: Current Concepts of Immunology and Infectious Diseases, Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care, January 2007, 37:7-36, DOI: 10.1016/j.cppeds.2006.10.002;
115. Malafaya PB, Stappers F; Reis RL. Starch-based microspheres produced by emulsion crosslinking with a potential media dependent responsive behavior to be used as drug delivery carriers, Journal of Materials Science. Materials in Medicine, 2006, 17(4), 371-377;
116. Mangione MR, Giacomazza D., Bulone D, Martorana V., Cavallaro G., San Biagio PL. K⁺ and Na⁺ effects on the gelation properties of k-carrageenan. Biophysical Chemistry journal, 2005, 113:129-135. doi:10.1016/j.bpc.2004.08.005; ISSN:0301-4622;
117. Mahdhi Abdelkarim et al, Preliminary Characterization of the Probiotic Properties of Candida famata and Geobacillus thermoleovorans; Iranian Journal of Microbiology, 129-134, volume 3, No 3, September 2011, ISSN 2008-3289 ; 2011;
118. Mandal S., Puniya A.K., Singh K., Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated Lactobacillus casei NCDC-298, International Dairy Journal, 16, 1190-1195, 2006, ISSN, 0958-6946;
119. Marsich E, Borgogna M, Donati I, Mozetic P, Strand BL, Salvador SG et al. Alginate /lactose-modified chitosan hydrogels: a bioactive biomaterial for chondrocyte encapsulation. Journal of Biomedical Materials Research 2008; 84:364-76; ISSN, 1549-3296;
120. Matlock Brian C., Beringer Richard W. et al; Analyzing Differences in Bacterial Optical Density Measurements between Spectrophotometers; Abstract 1730, 2011 Thermo Fisher Scientific Inc. www.thermoscientific.com ;
121. Mehanna Nayra S.H., Tawfik Nabil F., Salem Moussa M.E., Effat Baher A.M. and Gad El-Rab D.A., Assessment of Potential Probiotic Bacteria Isolated from Breast Milk Middle-East Journal of Scientific Research 14 (3): 354-360, ISSN 1990-9233, IDOSI Publications, 2013, DOI: 10.5829/idosi.mejsr.2013.14.3.2102;
122. Mladenovska K., Cruaud O., Richomme P., Belamie E., Raicki R.S., M. C. Venier-Julienne, Popovsk E. i, Benoit J.P. and Goracinova K.. 5-ASA loaded chitosan-Ca-alginate microcapsles: Preparation and physicochemical characterization. International Journal of Pharmaceutics. 345, 59-69 (2007b); ISSN: 0378-5173;
123. Mladenovska K., Raicki R.S., Janevik E.I., Ristoski T., Pavlova M.J., Kavrakovski Z., Dodov M.G. and Goracinova K., Colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid from chitosan-Ca-alginate microcapsles. International Journal of Pharmaceutics. 342.124-136 (2007a); ISSN:0378-5173;
124. Mokarram R.R., Mortazavi S.A., Habibi Najafi M.B., Shahioti, F. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice, Food Research International 42(2009) ; pp 1040-1045, ISSN: 0963-9969;
125. Monteiro SM et al; A Procedure for High-Yield Spore Production by Bacillus Subtilis; Pubmed (PMID-16080679) ; DOI:10.1021; ISSN:8756-7938; Biotechnology Progress 21,4, 1026-1031, 5 sept 2008;
126. Morais Inês P. A., Tóth Ildikó V., Rangel António O. S. S., Turbidimetric and Nephelometric Flow Analysis: Concepts and Applications; Spectroscopy Letters Journal vol. 39, no. 6, pp. 547-579, 2006 DOI: [10.1080/00387010600824629](https://doi.org/10.1080/00387010600824629);
127. Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Iranian Journal of Biotechnology (IJB) 2007; 5(1):1-18, ISSN : 1728-3043;
128. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying: an review. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66:183-193 ISSN 01677012;
129. Motohiro Shima, Yasunobu Morita., Matsatsugu Yamashita., Shuji Adachi . Protection of Lactobacillus acidophilus from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. Food Hydrocolloids 2006, 20, 1164-1169; ISSN [0268-005X](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.05.005);
130. Muhr AH, Blanshard JMV. Diffusion in gels. Polymer 1982; 23:1012-26 [http://dx.doi.org/10.1016/0032-3861\(82\)90402-5](https://doi.org/10.1016/0032-3861(82)90402-5);

131. Murtaza Ghulam, Ahamal Mahmood, Achtar Naved, Rasad Fatima, A comparative study of various Microencapsulation techniques effect on polymer viscosity on microcapsule characteristics, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol 22, No 3, July 2009, pp 291-300;
132. Naiaretti Daniela , Tita Ovidiu, *Biopolymers used in Food Packaging –A review*, *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: FOOD TECHNOLOGY* Vol. XVI (2012), no.2, ISSN 2344 – 150X;
133. Nedovic V.A., Obradovic B., Poncelet D., Goosen M.F.A., Leskosek Cukalovic I., Bugarski B. - Cell immobilization by electrostatic droplet generation, *Landbauforschung Volkenrode SH* 241(2002) 11-17; ISSN1569-268X;
134. Nedovic V.A., Obradovic B., Leskosek-Cukalovic I., Trifunovic O., Pesic R., Bugarski B., Electrostatic of alginate microbeads loaded with brewing yeast, *Process Biochemistry Journal*. 37 (2001) 17-22; DOI:10.1016/S0032-9592(01)00172-8; ISSN 00329592;
135. **Neamțu Bogdan**, Tița Ovidiu, Neamțu Mihai, Tița Mihaela, Hila Mirela, Maniu Ionela, Identification of probiotic strains from human milk in breastfed infants with respiratory infections, *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: FOOD TECHNOLOGY* Vol. XVIII (2014), no. 2 , ISSN:2344-150X
136. **Neamțu Bogdan**, Tița Ovidiu, Neamțu Mihai, Tița Mihaela, Hila Mirela, Maniu Ionela, Metode de laborator utile în analiza compoziției probelor de lapte matern și lapte praf, *Acta Medica Transilvanica* nr. 3 septembrie 2014 , ISSN-L 1453-1968
137. **Neamțu Bogdan**, Tița Ovidiu, Felicia Gligor, Neamțu Mihai, Tița Mihaela, Sbârcea Claudia, Hila Mirela, Maniu Ionela, A comparative study of emulsion and extrusion as encapsulation methods for probiotic growth media, *International Journal of Science and Advanced Technology*, 2014, ISSN: 2221-8386
138. **Neamțu Bogdan**, Grupul Roman de Experti in Nutritie Pediatrică, *Recomandări nutriționale în practica pediatrică, Capitol Nutriția în Terapia Intensivă*, Editura Universitară Carol Davila București, 2013, ISBN : 978-973-708-697-6;
139. **Neamțu Bogdan**, Ketney O, Tița AM, Tița O., Hila M, Melanica M, Neamtu LM , Neamtu C , Maternal and Endogenous IgA Protection in Infants with Respiratory Tract Infections *Archives of Disease in Childhood* 2012 Oct: 97(Suppl 2): 1-58 ISSN 14682044;
140. Oddy H Wendy, Why Breast Milk Has Health Benefits for Infants and Children : A Review, *Pakistan Journal of Nutrition* 1(3), 106 – 118, 2002, ISSN 1680 – 5194,
141. Oddy H Wendy., A Review of the Effects of Breastfeeding on Respiratory Infections, Atopy and Childhood Asthma; *Journal of Asthma* vol 41, No.6, pp. 605-621, 2004, Review Article, DOI :10.1081/JAS-200026402;
142. Olfat S. Barakat et al, Identification and Probiotic Characteristics of Lactobacillus Strains Isolated from Traditional Domiati Cheese; *International Journal of Microbiology Research*, vol 3, issue 1, 2011, pp 59-66, ISSN: 0975-5276 & E-ISSN : 0975 – 9174, 2011;
143. Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Pedraz JL. Development and optimisation of alginate-PMCG-alginate microcapsules for cell immobilisation. *International Journal of Pharmaceutics* 2003; 259:57-68; ISSN: [0378-5173](#)
144. Ouled-Haddar Houria, Idoni Tayeb, Sifour Mohamed, Guezira Messaouda, Bouthabet Messaouda, Isolation, Characterization and Microencapsulation of Probiotic Lactobacillus curvatus 67 from Chicken Crop, *The Online Journal of Science and Technology* - 2012, vol 2, ISSUE-1, ISSN:2146-7390 ;
145. Paul de Vos, Bucko Marck, Gemeiner Peter, Navratil Marian, Snitel Juraj, Faas Maurijke, Stiland Lakensgard Berif, Skjak-Brack Gudmund, March Yrr A., Vikartovska, Alica Lacik Igor, Kallarikova Gabriela, Onive Goroka, Poncelet Dennis, Pedraz Jase Luis, Ansoerge-Schummacher Marian B., Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology, *Biomaterials* 2009, ISSN: 0142-9612, pp: 2559-2570
146. Petrovic Tanja et al ,“Protection of probiotic microorganisms by microencapsulation”, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 13 (3) 2007, 169-174; DOI :10.2298/CICEQ 0703169P
147. Petreska Tania Ivanovska et al, “Microencapsulation of Lactobacillus Casei in Chitosan Microencapsulation of Lactobacillus Casei in Chitosan-Ca- Alginate Microparticles using Spray-Drying Method” *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*; 2012, ISSN :1857-5552, vol 31, No1, pp 115-123

148. Picot Arnaud and Lacroix Christophe, Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, *International Dairy Journal*, 505-515, 14, (2004); ISSN 09586946;
149. Pongjanyakul, T. Alginate-magnesium aluminum silicate films: Importance of alginate block structures. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, 365, 100-108; ISSN: 0378-5173;
150. Popovici Iuliana, Lupuleasa Dumitru, *Tehnologie Farmaceutica* volumul 3 , Editura Polirom, 2008, ISBN:978-683-635-5
151. Preetz C, Hauser A, Hause G, Kramer A, Mader K. Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: distinction of nanocapsules *European Journal of Pharmaceutical Science*. 2010; 39:141-151 ISSN 09280987;
152. Pruesse U., Vorlop K.D. - The jetcutter technology, *Int. Fundamentals of cell immobilization biotechnology*, V. Nedovic, R. Willaert (Eds.), Kluwer Academic Publishers, *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology, Focus on Biotechnology Volume 8A*, 2004, pp 295-309 (2004) pp. 295-309; ISSN1569-268X
153. Prüsse U., Dalluhn J., Breford J., Vorlop K.-D., Production of spherical beads by jetcutting, *Chemical Engineering and Technology*, 23, issue 12,(2000)11051110; DOI: 10.1002/15214125(200012)23:12<1105::AIDCEAT1105>3.0.CO;2-V
154. Reis CP, Neufeld RJ, Vilela S, Ribeiro AJ, Veiga F. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of Microencapsulation* 2006, 23:245-257; ISSN 1464-5246;
155. Robinson Siân and Fall Caroline; *Infant Nutrition and Later Health: A Review of Current Evidence*, *Nutrients* 2012, 4(8), 859-874; doi:[10.3390/nu4080859](https://doi.org/10.3390/nu4080859), ISSN 2072 – 6643, www.mdpi.com/journal/nutrients;
156. Rokka, S., Rantamaki, P. - Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: Challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology* 2010, 231-1-12; ISSN 1438-2385;
157. Shitara K.; Ikami I.; Munakata M; Muto O.; Sakata Y.. Hepatic Arterial Infusion of Mitomycin C with Degradable Starch Microspheres for Unresectable Intrahepatic Cholangiocarcinoma, *Clinical Oncology*, 2008, 20(3), 241-246; a, DOI: 10.1016/j.clon.2007.12.007
158. Sparks R.E., Norbert M., Method for coating particles or liquid droplets; US Patent 4675140, June 6, (1987)
159. Sandoval-Castilla O., Lobato-Calleros C., Garcia-Galindo H.S, Alvarez-Ramirez J., Vernon-Carter EJ. Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *L.casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International* 2010; 43:111-117. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.010] ISSN, 0963-9969.
160. Sasimar-Wbraharn et al 2010, *African Journal of Microbiology Research* vol 4(20); pp 2086-2093, 18 oct 2010. ISSN 1996-0808 - "Survival enhancement of probiotic *Lactobacillus plantarum* CMU-FP002 by granulation and encapsulation techniques"
161. Schmidt JJ, Rowley J, Kong HJ. Hydrogels used for cell-based drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research* 2008; 87:1113-32; ISSN 0976 – 3333
162. Sefton M V, May M H, Lahooti S & Babensee J E (2000) Making microencapsulation work, conformal coating, immobilization gels and in vivo performance, *Journal of Controlled Release* 65, 173-186; ISSN: 0168-3659.
163. Se-Jin Kim, Seung Yong Cho, Sae Hun Kim, Ok-Ja Song, Il-Shik Shin, Dong Su Cha, Hyun Jin Park, Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 *LWT-Food Science and Tehnology* 41(2008) pp 493-500 ISSN: 0023-6438,
164. Simon Benita. *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*. 2nd ed. vol 158, *Drugs and The Pharmaceutial Siences*; Informa Healthcare, New York, USA, 2006; ISBN -13 : 978-0-8247-2317-0
165. Siriwan Nawong et al, Isolation and Selection of Probiotic Lactic Acid Bacteria from Cassava Pulp for Cholesterol Lowering Property, 13th ASEAN Food Conference, 9-11 September 2013, Singapore, Meeting Future food Demands : Security & Sustainability, 2013; www.cvent.com;
166. Sohail A et al - Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method, *International Journal of Food Microbiology* 2011 Jan 31 145(1) : 162-8, DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.007. Epub 2010, dec 28;; ISSN:0168-1605;

167. Sultana K., Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapaty K, Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, *International Journal of Food Microbiology*, 62, 47-55, ISSN : 0168-1605
168. Tapia C, Escobar Z, Costa E, Sapag-Hagar J, Valenzuela F, Basualto C, Gai MN, Yazdani-Pedram M. Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan-alginate and chitosan-carrageenan as prolonged diltiazem chloride release system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004, 57:65-75; ISSN: 0939-6411
169. Țița Ovidiu- Aspecte privind utilizarea celulelor de drojdie imobilizate"; *Buletinul AGIR nr 3/2003 iulie - septembrie*, - ISSN 2247-3548;
170. Tilxeira P., Castro H., Mohacsi-Farkas C., Kirby R., Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress, *Journal of Applied Microbiology* 83 (1997) 219-226 ; DOI: 10.1046/j.1365-2672.1997.00221.x; ISSN:1364-5072
171. Umer Hammad, Nigam Hemlata, Tamboli Asif M., Sundara M., Nainar Moorthi, Microencapsulation: Process, Techniques and Application, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, ISSN: 2229-3701, vol 2(2), Apr-Jun 2011, www.ijrpbsonline.com, pp 474-481;
172. Upoahyay Avand Joshi Ambarish, "Fabrication of starch based microcapsules by an emulsification crosslinking method; *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2011, 3(6): 839-845, ISSN 0260-8774
173. Vasile Aida, Miron Tudor Lucian, Paraschiv Daniela, Bahrim Gabriela, Dima Stefan, "The enhancement of growth ability and the viability of some probiotic bacteria in media with *origanum vulgare* L. extract", *Romanian Biotechnological Letters*, vol 16, No 6, 2011, pp 6847-6853; ISSN 12245984;
174. Vandamme T F, Lenourry A. Charrueau C & Chaumeil J (2002) The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate Polymers* 48, 219-231; ISSN: 0008-6215;
175. Vamanu E; *Biotechnologies Used to Obtain Probiotic Biomass in Batch-System*; *Archiva Zootechnica* ; vol 13; No4, 64-71, 2010; ISSN : 1016-4855;
176. Vodnar Dan C., Socaciu Carmen, Green tea increases the survival yield of bifidobacteria in simulated gastrointestinal environment and during refrigerated conditions"; *Chemistry Central Journal* 2012, 6:61 doi: 10.1186/1752-153x-6-61" ISSN 1752-153X ;
177. Vidhyalakshmi R. et al, "Encapsulation The Future of Probiotics" - A Review 2009, *Advances in Biological Research* 3(3-4): 96-103; ISSN: 1992-0067
178. Wei Ouyang, Hangwei Cheu, Mitchell L. Jones, Tasima Haque, Christopher Martini, Fatane Afkhami and Satya Prakash, Novel multilayer APPPA microcapsules for oral delivery: preparation condition, stability and permeability.; *Indian Journal of Biochemistry Biophysics*, 2009, vol 46, pp 491-497; ISSN: 0301-1208;
179. Work Group on Breastfeeding, Breastfeeding and the Use of Human Milk , SECTION ON BREASTFEEDING , *Pediatrics : Official Journal of the American Academy of Pediatrics*. Vol 129 , Number 3 , 2012 , DOI : 10.1542/peds2011-3552, ISSN:0031-4005;
180. Wnek GE, Bowlin GL. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*, 2nd ed. Wnek GE, Eds.; Informa Healthcare, New York, USA, 2008, vol 1-4; ISBN 9781420078022
181. Xiao Yan Li, Xi Guang Chen, Doug Su Cha, Mynn Jin Park, Cheng Steng Lin, "Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate-gelatin and its properties"; *Journal of Microencapsulation*, 2009, 26(4), pp 315-324 ISSN 1464-5246
182. Y Fang; L Wang; D Li; B Bhandari; X D Chen; Z Mao. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 10.1016/j.carbpol.2008.03.005
183. Yin C, Chia SM, Quek CH, Yu H, Zhuo RX, Leong KW, et al. Microencapsulation with improved mechanical stability for hepatocyte culture, *Biomaterials* 2003; 24:1771-80 ISSN: 0142-9612;
184. Yavuzdurmaz Hatice, Harsa Sebnem, Selection of potential probiotic lactobacillus strains from human milk; *International Congress on Engineering and Food*, May 2011;
185. Yu, J., Liu, J., Effects of suspension crosslinking reacting conditions on the size of starch microspheres. *Starch/Stärke, Journal of Food Engineering* 46 (7), 252-255 doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.08.011
186. Yuan Kun Lee, Seppo Salminen; *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2nd Edition, Wiley, ISBN:978-0-470-13544-0, 2009

187. Yaguchi, Y.; Thuy, T.T.T.; Urakawa, H.; Kajiura, K. Structural characteristics carrageenan gels: Temperature and concentration dependence. *Food Hydrocolloids* 2002, 16, 515-522; ISSN 0268-005X;
188. Zavisic Gordana et al, Probiotic Features of Two Oral Lactobacillus Isolates ; *Brazilian Journal of Microbiology* (2012): 418-428; ISSN:1517-8382 ; 2012;
189. Zinedinde A. and Faid M ; Isolation and Characterization of Strains of Bifidobacteria with Probiotic Properties In vitro; *World Journal of Dairy & Food Sciences* 2 (1) : 28-34, 2007, ISSN:1817-308X;
190. Zheng Y. et al, Probiotic Properties of Lactobacillus Strains Isolated from Tibetan Kefir Grains; *PLoS ONE* 8(7) : e69868 ; DOI : 10.371/journal.pone.0069868, 2013;

Publicații:

- 1. Neamțu Bogdan**, Țița Ovidiu, Felicia Gligor, Neamțu Mihai, Țița Mihaela, Sbârcea Claudia, Hila Mirela, Maniu Ionela, A comparative study of emulsion and extrusion as encapsulation methods for probiotic growth media, *International Journal of Science and Advanced Technology*, 2014 ISSN: 2221-8386
- 2. Neamțu Bogdan**, Țița Ovidiu, Neamțu Mihai, Țița Mihaela, Hila Mirela, Maniu Ionela, Identification of probiotic strains from human milk in breastfed infants with respiratory infections, *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: FOOD TECHNOLOGY* Vol. XVIII (2014), no. 2 , ISSN:2344-150X
- 3. Neamțu Bogdan**, Țița Ovidiu, Neamțu Mihai, Țița Mihaela, Hila Mirela, Maniu Ionela, Metode de laborator utile în analiza compoziției probelor de lapte matern și lapte praf, *Acta Medica Transilvanica* nr. 3 septembrie 2014 , ISSN-L 1453-1968
- Chicea D, **Neamțu B** , Chicea R., Chicea L. M. - The Application of AFM for Biological Samples Imaging , *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, Vol. 5, No 3, July - September 2010, p. 1033 - 1040; ISSN 1842 - 3582
- Neamțu B** , Ketney O.Țița, M.Țița, Hila M, Melanica M, Neamțu LM , Neamțu C , Maternal and Endogenous IgA Protection in Infants with Respiratory Tract Infections *Archives of Disease in Childhood* 2012 Oct: 97(Suppl 2): 1-58 ISSN 14682044;
- Neamțu Bogdan**, Grupul Roman de Experți în Nutriție Pediatrică, Recomandări nutriționale în practica pediatrică, *Capitol Nutriția în Terapia Intensivă*, Editura Universitară Carol Davila București, 2013, ISBN : 978-973-708-697-6;
- S.I. Iurian, S. Iurian, M.L. Neamțu, **B.M. Neamțu**, V. Bunescu. *Statistic Evaluation of Streptococcus Resistance to antibiotics in children*. *Pediatric Research* 68, 591-591 doi:10.1203/00006450-201011001-01195 ISSN: 0031-3998, November 2010
- S.I. Iurian, S. Iurian, M.L. Neamtu, **B.M. Neamțu**, B.I. Mehedintu. *Epidemiological Aspects of Salmonella and Shigella infections in children*. *Statistics of Pediatric Clinic* , *Pediatric Research* 68, 591-591 doi:10.1203/00006450-201011001-011962010 ISSN: 0031-3998 November 2010