

## REZUMAT

### CERCETĂRI ASUPRA DINAMICII UNOR POPULAȚII MICROBIENE PE PARCURSUL PROCESELOR FERMENTATIVE

Doctorand: VRĂJMAȘU Virgiliu Valeriu

Conducător științific: *Prof. univ. dr. MATEI Florentina*

**CUVINTE CHEIE:** alimente fermentate, qPCR, *bacterii lactice*, *bacterii acetice*, *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces*

Cercetările din prezenta lucrare fac obiectul tezei de doctorat intitulată „**CERCETĂRI ASUPRA DINAMICII UNOR POPULAȚII MICROBIENE PE PARCURSUL PROCESELOR FERMENTATIVE**” din cadrul Școlii Doctorale a USAMV din București.

Fermentația este un proces metabolic complex prin care un organism transformă un glucid, în diferite produse, cum ar fi un alcool sau un acid. De exemplu, drojdia prin procesul de fermentație transformă zahărul în alcool. Bacteriile lactice transformă prin fermentație carbohidrații în acid lactic. Acest proces este utilizat pentru a produce diferite produse alimentare, precum bere, vin, iaurt sau alte tipuri de produse de interes farmaco-cosmetic.

Fermentația este un proces natural. Oamenii au folosit procesul de fermentație pentru a produce produse precum vin, brânză și bere cu mult înainte de înțelegerea procesului biochimic. În anul 1850, Louis Pasteur a devenit primul om de știință care a studiat fermentația atunci când s-a dovedit a fi provocată de celulele vii. Cele mai importante procese fermentative sunt: fermentația alcoolică, fermentația lactică și fermentația acetică. În fermentația alcoolică, drojdiile și anumite bacterii, efectuează fermentația carbohidraților, proces prin care acidul piruvic este desfacut în etanol și dioxid de carbon; acest proces este specific producției de pâine, vin sau bere. În fermentația lactică, lactoza este transformată prin acid piruvic în acid lactic. Acest tip de fermentare este utilizat pentru producția de brânză și produse lactate. Fermentația acetică este un alt tip de fermentație și este produsă de bacterii acetice și ca produs intermediar rezultă acid acetic. Prin fermentarea acetică a vinului obținem oțetul. Fermentația acetică este, de asemenea, utilizată pentru conservarea murăturilor. Deși este considerată fermentație, aceasta se efectuează în prezența oxigenului.

În timpul acestor fermentări, care se desfășoară pe surse naturale de carbohidrați (struguri, lapte, cereale etc.), biodiversitatea și nivelurile microbiene se află într-o continuă schimbare. Pentru obținerea celui mai bun produs final este important să se efectueze un proces optim de fermentare, în care microorganismele implicate sunt un factor important.

Pentru a caracteriza biodiversitatea microbiană a fermentației, abordarea este complexă și ar trebui să se țină seama de metodele fenotipice și genotipice și să se stabilească o corelație între rezultatele acestor metode. În contextul în care procesele fermentative sunt procese de bază pentru obținerea de alimente, inclusiv funcționale, utilizarea unor tehnici moderne de monitorizare a populațiilor microbiene pe parcursul acestor procese a devenit o necesitate, dacă nu o obligativitate.

Experimentele au fost derulate în două locații principale, respectiv în laboratorul de Microbiologie aplicată din cadrul Facultății de Biotehnologii din USAMV București și în laboratorul de diagnostic molecular al societății Vetwork Diagnostics din Tulcea, care furnizează servicii de laborator în domeniul sănătății animale și siguranței alimentelor.

Obiectivele specifice au fost următoarele:

1. Dezvoltarea metodologiei qPCR de cuantificare a populațiilor de bacterii lactice și bacterii acetice în produse fermentate de tip Kombucha
2. Dezvoltarea unei metode qPCR pentru cuantificarea populațiilor totale de *Hanseniospora* versus *Saccharomyces* în cadrul procesului de vinificație
3. Detectarea și cuantificarea populațiilor viabile ale unor specii *Saccharomyces* și *non-Saccharomyces* din procesele de vinificație prin tehnica qPCR

Teza este structurată în două părți principale: partea de documentare și partea de cercetări proprii, ce au fost prezentate în 6 capitole, la care s-au adăugat introducerea, rezumatul, concluzii generale și recomandări și bibliografia.

Prima parte a lucrării conține 2 capitole.

În primul capitol s-a realizat o sinteză a literaturii de specialitate în ceea ce privește principalele fermentații de interes alimentar, cu accent pe dinamica microbiană în procesul fermentației alcoolice în vinificație și dinamica microbiană în băuturile de tip Kombucha, produse care au fost preluate în partea experimentală.

În cel de-al doilea capitol s-au trecut în revistă principalele metode de monitorizare a populațiilor microbiene pe parcursul proceselor microbiene, accentul fiind pus pe metodele moleculare, în special pe tehnica qPCR.

A doua parte a tezei de doctorat cuprinde 4 capitole, care descriu cercetările experimentale proprii.

În capitolul III s-a urmărit dezvoltarea metodologiei qPCR de cuantificare a populației de bacterii lactice și acetice în produsele fermentate de tip Kombucha. Scopul experimentelor a fost acela de obținere a unui produs complex, care include diverși compusi din domeniul sanatații, prin fermentarea polenului colectat de la albine cu un consorțiu Kombucha. Pe parcursul procesului de macerare-fermentare a polenului cu Kombucha au fost determinate nivelurile populațiilor de bacterii lactice (LAB) și bacterii acetice prin tehnici clasice și moleculare, comparativ cu nivelurilor acestor grupe de bacterii din produsul fermentat de Kombucha. Adăugând polen la începutul fermentației, nivelul inițial de LAB crește cu aproape două unități logaritmice, până la  $10^7$  UFC / ml. Această creștere importantă a populației de LAB este datorată conținutului de LAB din polen provenit cel mai probabil de la speciile *Lactobacillus* sp. din stomacul albinelor. Astfel, s-a dovedit astfel că adaosul de polen crește proprietățile probiotice ale produsului final. La nivel de laborator s-a observat un nivel mai scăzut ( $10^7$  CFU / ml) decât cel rezultat în urma studiilor pilot de 100L ( $10^9$  CFU / ml). Astfel, instalațiile de fermentație cu volum mare de lucru îmbunătățesc efectul de polen al creșterii populației microbiene LAB. Referitor la bacteriile acetice, nivelul inițial al acestora diferă cu o unitate logaritmică în cazul adaosului de polen ( $10^3$  celule/mL în Kombucha fără polen și  $10^4$  celule/mL în Kombucha cu polen), dar la finalul macerării-fermentării nivelul se stabilizează în ambele cazuri la  $10^6$  celule/mL. S-a dovedit că tehnica qPCR este o tehnică fezabilă de cuantificare a încărcăturii totale de bacterii lactice, și acetice din Kombucha. De asemenea, pe parcursul experimentelor, s-a utilizat cu succes tehnica qPCR poate fi folosită pentru evaluarea conținutului polenului în bacterii lactice.

În capitolul IV studiul a propus dezvoltarea unei metode moleculare pentru cuantificarea populațiilor de *Hanseniospora* și *Saccharomyces* în timpul procesului de vinificație, după adaos inițial de culturi starter selecționate. Primeri specifici și sonda SYBR Green au fost utilizate pentru metoda qPCR în timp real și diluții dintr-o tulpină de referință a genului *Hanseniospora* și *Saccharomyces* au fost folosite pentru curba de calibrare. După ce metoda a fost dezvoltată, a fost utilizată pentru a studia diferite probe de must de struguri și vin, în urma unei fermentații naturale sau controlate cu tulpini comerciale de drojdie.

Pentru curba standard s-a obținut un coeficient de corelație foarte bun, respectiv  $R^2 = 0,9927$  și o valoare a RSDr = 0,25%. Limita de detecție a arătat necesitatea prezenței unui maxim de  $C_t$  egal cu 32 pentru o reacție pozitivă cu SYBR-Green. Valoarea eficienței amplificării a fost de 90% pentru această reacție qPCR, încadrându-se în criteriile de validare cu un  $R^2$  mai mare de 0,98 și o pantă cu o valoare între -3,1 și -3,6.

În toate probele de vin analizate s-au obținut valori aproape similare pentru populația *Hanseniospora*, probelor de must de struguri au avut o concentrație inițială mai mare decât a vinurilor, iar probele de must cu

sulfizi au înregistrat cele mai mari concentrații. În cazul probelor de must, concentrația populațiilor de *Hanseniospora* a fost mai mare decât cea a populațiilor de *Saccharomyces* în faza inițială și finală a fermentației, fiind depășită în timpul perioadei de fermentație. Rezultatele noastre sunt în conformitate cu alte rapoarte și susțin ideea că qPCR este o tehnică rapidă, directă (non-cultivabilă), sensibilă și fiabilă pentru cuantificarea numărului total de celule a diferitelor specii de drojdie.

În capitolul V s-a urmărit dezvoltarea unei metode de cuantificare a populațiilor viabile ale unor specii de *Saccharomyces* și *non-Saccharomyces* folosind monoazida de propidium (PMA), compus chimic care este capabil să pătrundă în celulele cu membrană compromisă sau în celulele moarte și se leagă covalent la acidul nucleic după fotoactivare. S-a propus dezvoltarea unei metode de cuantificare pentru speciile *Candida stellata*, *Torulaspora delbrueckii* și *Wickerhamomyces anomalus*, menținând ca și element central drojdia *S.cerevisiae*. Având în vedere faptul că, din punct de vedere metabolic, celulele viabile sunt importante, pentru ca acestea conduc la diferite caracteristici organoleptice ale vinului, de data aceasta s-a propus cuantificarea celulelor viabile ale acestor specii. Pe parcursul testărilor s-a observat o scădere ușoară a viabilității în urma tratamentului cu PMA a celulelor viabile.

Pantele curbelor standard au fost aproape similare, ceea ce a corespuns unor eficiențe de amplificare între de 91,17 % și 95,98 %, evidențiind o relație liniară ( $R^2$ ) cuprinsă între 0,9908-0,9959.

Limita de detecție a variat de la 38 fg/ $\mu$ L la 49 fg/ $\mu$ L, ceea ce corespunde limitelor de cuantificare de la 70 CFU/mL la  $1,03 \times 10^2$  CFU/mL. În cazul *W. anomalus*, limitele de detecție și de cuantificare sunt prea mari necesitând o optimizare suplimentară.

În urma procesului de optimizare, am constatat că aplicarea PMA-qPCR pe probele de vin ar putea produce rezultate într-o zi lucrătoare, prezentând astfel un mare avantaj în comparație cu cele 5-7 zile necesare pentru a obține rezultate din metodele convenționale de cultură.