

1. OBIECTUL MICROBIOLOGIEI. ISTORICUL MICROBIOLOGIEI. CLASIFICAREA GENERALĂ A MICROORGANISMELOR

1.1. OBIECTUL MICROBIOLOGIEI

Microbiologia este o știință fundamentală care studiază morfologia, fiziologia și sistematica microorganismelor, originea și evoluția lor, fenomenele de ereditate și variabilitate microbiană. Etimologia cuvântului provine din limba greacă: **micros = mic; bios = viață; logos = știință.**

Microorganismele sunt sisteme cu organizare complexă, monocelulare sau pluricelulare, cu metabolism propriu și continuitate genetică, cu o infinită diversitate a caracterelor morfologice și fiziologice. În sensul acestei definiții din imensul grup al microorganismelor fac parte fungii (drojdii – levuri și mucegaiuri – fungi filamentoși), bacterii, alge microscopice, protozoare etc.

În funcție de natura microorganismelor și caracterul lor aplicativ, s-au dezvoltat în timp, următoarele științe microbiologice independente:

Microbiologia generală studiază legile de dezvoltare a tuturor grupelor de microorganisme și a rolului lor în circuitul substanțelor în natură. Fiind o știință de sinteză, în funcție de natura microorganismelor studiate s-au desprins următoarele discipline:

Virusologia (inframicrobiologia) studiază virusuri – entități acelulare cu dimensiuni submicroscopice, agenți ai bolilor virale la om, animale, plante, insecte, microorganisme (bacterii, fungi).

Bacteriologia studiază bacteriile, celule monocelulare de tip procariot, care pot produce îmbolnăviri ale omului, animalelor, plantelor.

Micologia studiază fungi cu celule monocelulare sau pluricelulare de tip eucariot.

Dintre științele microbiologice cu caracter aplicativ fac parte:

- **microbiologia chimică** – este o ramură a microbiologiei generale care s-a dezvoltat în ultimii 50 de ani, are ca obiect de studiu chimia și biochimia microorganismelor (compoziția chimică, structura, topologia, funcția moleculelor libere și asociate, metabolismul substanțelor în celula microbiană;
- **microbiologia solului, a apei, microbiologia geologică, fitopatologia, microbiologia sanitară, agricolă, ecologică, cosmică, genetica microbiană, biologia moleculară;**
- **microbiologia produselor alimentare** are drept obiect de studiu cunoașterea naturii și activității metabolice a microorganismelor care pot contamina întregul lanț alimentar, de la materiile prime la produsele finite, în scopul prevenirii alterării lor și pierderea valorii alimentare sau a îmbolnăvirii prin consum de alimente, contaminate cu microorganisme patogene-toxicogene;
- **microbiologia industrială (tehnică)** reprezintă știința de investigare și control al fermentațiilor, respectiv de folosire a microorganismelor în calitate de reactivi, în scopul obținerii industriale a unor produse cu valoare economică. Prin dezvoltarea microbiologiei industriale, cu ajutorul microorganismelor se obțin avantajos aproximativ 200 de produse, printre care: alcoolul etilic și butanolul, acetona, acidul citric, acidul lactic, aminoacizi, enzime, proteine, vitamine, insecticide biologice, produse de biosinteză ce se obțin pe plan mondial în cantități mari (milioane tone per an) sau vaccinuri, vitamine și enzime purificate, hormoni de creștere, interferonul, antibiotice, în cantități

mici. Primul patent înregistrat pentru un produs de biosinteză microbială datează din 1882 pentru enzime proteolitice folosite la tăbăcirea pieilor;

- **biotehnologia** reprezintă un domeniu multidisciplinar al științei, tehnicii, tehnologiei și al producției industriale ce se bazează pe potențialul microorganismelor rezultate prin tehnici de inginerie genetică și a enzimelor microbiene, în scopul obținerii de bunuri industriale, energetice, agricole, farmaceutice, alimentare și protecția mediului.

1.2. ISTORICUL MICROBIOLOGIEI

Dacă apariția vieții pe pământ se aproximează că a avut loc cu 3,8-4 miliarde de ani în urmă, cele mai vechi celule aparținând bacteriilor metanogene și bacterii ale genului *Clostridium* descoperite în lave vulcanice pietrificate, au existat de cel puțin 2 miliarde de ani. Celulele eucariote s-au transformat cu 1500 milioane de ani în urmă și diversificarea acestora acum 400 milioane de ani, a condus la apariția într-o lungă perioadă de timp a strămoșilor plantelor de astăzi.

În contrast cu dimensiunile atât de mici ale microorganismelor, rolul lor în natură este imens. Implicate direct în uriașele transformări ale materiei organice nevii, prin procese de putrefacție-putrezire, fermentații etc., microorganismele asigură în natură un circuit al principalelor elemente universale ce intră în structura organismelor vii și au rol vital în menținerea ecosistemelor, deoarece fără activitatea lor **„pământul s-ar transforma într-un uriaș cimitir”**.

Deși procesele microbiene sunt cunoscute de la începutul omenirii, explicația științifică a cauzelor care le determină, a fost posibilă numai odată cu descoperirea microscopului. Cel care a utilizat pentru prima dată microscopul pentru studiul microorganismelor a fost Anthonie van Leeuwenhoek.

Microbiologia apare ca știință în a doua jumătate a secolului XVII și debutează cu o perioadă lungă de observații morfologice când se acumulează un material vast privind caracterele și răspândirea în natură a microorganismelor.

Cea de a doua perioadă în dezvoltarea microbiologiei este perioada fiziologică, inaugurată de lucrările marelui savant, chimist și medic, Louis Pasteur care a stabilit principiile de bază ale microbiologiei prin descoperiri de importanță fundamentală.

Louis Pasteur studiază condițiile de distrugere a microorganismelor stabilind procedee de sterilizare. Studiază bolile microbiene ale vinului și berii produse de microorganisme – agenți ai fermentației lactice și butirice și care pot să trăiască și în absența aerului. Pasteur stabilește modalitatea de tratare a vinului prin încălzire la 60°C care îi asigură conservabilitatea, operație denumită în prezent pasteurizare și este pe drept cuvânt, considerat părintele microbiologiei industriale. Visul lui Pasteur era să descopere microorganismele care provocau îmbolnăviri ale omului și animalelor. A studiat boli ca holera găinilor, infecția cărbunoasă, rabia etc. și a realizat vaccinurile antiholerice și antirabice, dovedind că unul și același microb este cel care poate produce moartea, în schimb după un tratament adecvat poate da doar forme ușoare de boală și concomitent o imunitate organismului vaccinat. Până în ultima clipă a vieții a muncit neobosit pentru binele omenirii. Impresionant este crezul vieții lui, exprimat simplu în cuvintele: **„Voința, munca și succesul sunt cuprinsul vieții omenești. Voința deschide porțile, munca te trece prin ele, iar la sfârșitul drumului vine succesul ca o încoronare a tuturor eforturilor”**.

Robert Koch considerat părintele școlii germane de microbiologie stabilește că microbii sunt cauzele bolilor infecțioase și descoperă vibriunea holerei, agentul tuberculozei etc., studii ce-i aduc în 1905 premiul Nobel pentru fiziologie și medicină. Koch introduce în practica de laborator mediile de cultură solidificate ceea ce a permis izolarea în culturi pure a microorganismelor din natură. Folosirea culturilor pure s-a extins odată cu realizarea de aparatură destinată sterilizării mediilor necesare pentru cultivare.

Un rol important în introducerea culturilor pure în industrie aparține savantului german **E.H. Hansen** care a utilizat microorganismele drept inocul ai fermentațiilor, fapt ce a condus la microbiologia industrială modernă.

Descoperirea primului antibiotic, penicilina de către **A. Fleming** și stabilirea tehnologiei de producere și purificare a acestui antibiotic de către Florey și Chain reprezintă una dintre cele mai importante realizări ale începutului de secol XX. Omenirea devine astfel posesoarea unei noi arme împotriva microorganismelor patogene și sunt intens stimulate cercetările de descoperire și aplicare în terapeutică a noi antibiotice cu spectru specific de acțiune.

Fondatorul microbiologiei românești este **Victor Babeș**, care a condus prima catedră de învățământ medical de anatomie patologică și bacteriologică. Împreună cu francezul V. Cornil este autorul primului tratat de bacteriologie apărut în lume: „Les bactéries”, în anul 1885. Victor Babeș a studiat boli ca turbarea, morva, lepra, holera, tuberculoza, parazitoze și a introdus pentru prima dată în țara noastră tratamentul prin serotapie – imunizare cu serul provenit de la animale în prealabil vaccinate. Este considerat unul dintre cei mai mari savanți, a rămas în microbiologie prin numeroasele sale descoperiri.

Ioan Cantacuzino a creat o școală de microbiologie având ca centru institutul care îi poartă numele, organizând și dezvoltând activitatea de producție a serurilor și vaccinurilor folosite în combaterea bolilor infecțioase.

În domeniul imunologiei, virusologiei și microbiologiei generale, se remarcă savanții: **C. Lavaditi, D. Combiescu, M. Ciucă, Șt. Nicolau** etc. care și-au consacrat activitatea științifică, combaterii și eradicării unor boli, pentru formarea și dezvoltarea școlii contemporane de microbiologie.

1.3. CLASIFICAREA GENERALĂ A MICROORGANISMELOR

Variabilitatea extraordinară a microorganismelor și capacitatea lor de adaptare la cele mai diferite condiții ale mediului ambiant, fac ca lumea microbiană la nivel planetar să fie deosebit de numeroasă și greu de clasificat.

Clasificarea biologică a lumii vii propusă de Whittaker (1969), acceptată de numeroși taxonomiști cuprinde un sistem de cinci regnuri în funcție de modul de organizare celulară și modalități de nutriție, având următoarea structură:

- **regnul Monera** include organisme monocelulare de tip procariot cu nutriție de tip absorbtiv, cu metabolism fotosintetic sau chimiosintetic și reproducere prin diviziune asexuată;
- **regnul Protista** include organisme monocelulare de tip eucariot (inclusiv drojdii). Modul de nutriție este diferit de la un grup la altul, prin absorbție sau ingestie și reproducere sexuată/asexuată;
- **regnul Fungi** cuprinde organisme multinucleate de tip eucariot (mușci și ciuperci) cu nucleii dispersați în citosolul hifelor adesea septate, lipsite de plastide și

pigmenți fotosintetici, cu nutriție de tip absorbtiv și reproducere pe cale sexuată și asexuată;

- **regnul Plantae**, cu organisme multicelulare de tip eucariot, cu perete celulozic, vacuole în citoplasmă și pigmenți fotosintetici în plasmide. Modul principal de nutriție este cel fotosintetic și reproducerea predominant sexuată;
- **regnul Animalia**, cu organisme multinucleate de tip eucariot fără perete celular, cu nutriție predominant prin ingestie și reproducere sexuată.

Celula de tip procariot ce aparține primelor forme de viață pe Pământ, prezintă un nucleoid nediferențiat, lipsit de membrană nucleară. Molecula de ADN conține întreaga informație genetică; celula procariotă nu conține în citozol organe libere (cu membrană) și ribozomii au dimensiuni mici. Sunt puțin diferențiate din punct de vedere morfologic.

Celula de tip eucariot, mai evoluată, prezintă un nucleu bine diferențiat în care este inclusă partea predominantă a genomului alcătuit dintr-un set de cromozomi, care în timpul procesului de înmulțire se divizează și se repartizează între celulele rezultate. În cromozomi, ADN-ul este cuplat cu proteine de tipul histonelor. În celula eucariotă există organe simple prevăzute cu membrană, iar ribozomii au dimensiuni mai mari decât la procariote.

Pentru sistematizarea microorganismelor, se studiază întotdeauna caracterele morfologice, fiziologice, biochimice etc. ale culturii pure, cultură ce rezultă prin înmulțire dintr-o singură celulă (sau unitate formatoare de colonie), în mediu nutritiv steril și deci cuprinde celule aparținând unei singure specii.

În clasificări, pe bază de criterii morfologice și fiziologice riguroase, stabilite de la general la particular, principalele grupe de microorganisme componente ale regnurilor citate sunt clasate în diviziuni, clase și subclase, ordine, familii, triburi, genuri și specii.

La baza tuturor clasificărilor este situată specia, produs al evoluției materiei vii, ca rezultat al adaptării la condițiile existente ale mediului ambiant.

Specia corespunde populației de indivizi cu numeroase proprietăți comune, denumite caractere cu specificitate de specie, care le disting de alte specii. Microorganismele aparținând unei specii au aceeași origine, sunt adaptate la un anumit mediu de viață, au metabolism asemănător și sunt apropiate între ele prin caractere genetice. Specia la microorganisme este denumită din două cuvinte, primul fiind numele genului, care include mai multe specii. Cel de al doilea cuvânt scris întotdeauna cu literă mică, de obicei definește un caracter specific. În cadrul speciei se diferențiază prin caractere distinctive limitate, subspecii, tulpini, varietăți.

Genul cuprinde una sau mai multe specii pe baza unor caractere comune, specifice de gen. Denumirea genului este în limba latină.

Tribul reprezintă un grup de genuri înrudite.

Familia este un grup de triburi sau genuri înrudite.

Ordinul reprezintă un grup de familii înrudite.

Clasa reprezintă gruparea ordinelor înrudite.

2. CARACTERIZAREA PRINCIPALELOR GRUPE DE MICROORGANISME UTILIZATE ÎN SCOPURI INDUSTRIALE

În procesele microbiologice industriale microorganismele sunt utilizate pentru următoarele scopuri:

- multiplicarea celulelor în scopul obținerii de culturi starter sau biomasă;
- supersinteza intra/extracelulară a metaboliților primari, metaboliților secundari, poliglucide capsulare și a enzimelor microbiene cu importanță practică deosebită;
- procese de bioconversie (biotransformarea substraturilor specifice) cu aplicații industriale diverse și depoluarea mediului ambiant.

Utilizarea microorganismelor în bioprocesele industriale este avantajoasă datorită proprietăților lor biologice particulare și anume:

- viteza deosebit de mare a reacțiilor metabolice specifice microorganismelor face ca procesele de biosinteză să aibă loc extrem de rapid comparativ cu procesele similare la plante sau animale;
- se dezvoltă rapid pe diverse medii producând degradări, modificări și substituiri ale componentelor diferitelor substraturi pe care se dezvoltă și realizează cu ușurință transformări a căror realizare prin procedee chimice ar necesita un număr mare de operații laborioase și o tehnicitate ridicată;
- datorită capacității de adaptare la medii cu compoziții chimice foarte diferite, microorganismele pot utiliza o gamă extinsă de materii prime, uneori lipsite de valoare economică, ceea ce permite utilizarea unor substraturi ieftine pentru obținerea pe cale biologică a unei game largi de produse utile;
- posibilitatea creșterii randamentului de biosinteză prin metode culturale sau manipulări genetice.

În orice proces microbiologic cultura microbiană utilizată are importanță primordială în desfășurarea procesului și randamentelor obținute, ea reprezentând cheia succesului sau eșecului proceselor.

Microorganismele utilizate în procesele microbiologice industriale trebuie să posede următoarele calități:

- să prezinte tulpini stabile genetic;
 - să producă mai multe tipuri de celule (vegetative, spori sau alte unități reproductive);
 - să nu fie contaminate cu alte microorganisme;
 - să crească viguros și rapid după inoculare în vasele de cultivare utilizate pentru prepararea inoculului înainte de fermentația industrială;
 - să realizeze bioprocesul dorit într-o perioadă scurtă de timp (preferabil în 3 zile sau mai puțin) și să aibă capacitatea de a crește pe medii cu componente ieftine și ușor de procurat;
 - cultura microbiană să poată fi ușor conservată în timp fără a-și schimba proprietățile biochimice și genetice;
 - să prezinte stabilitate metabolică și să asigure desfășurarea de procese metabolice reproductibile;
 - să se preteze la schimbări sub acțiunea agenților mutageni sau prin inginerie genetică, în vederea obținerii de tulpini programate cu randamente sporite de biosinteză și stabilitate metabolică deosebită.
-

Microorganismele cele mai utilizate în scopuri industriale aparțin următoarelor grupuri:

- fungi:
 - o drojdii (levuri);
 - o mucegaiuri (micromicete, fungi filamentoși);
- bacterii;
- alge microscopice.

2.1. DROJDII (LEVURI)

Drojdii reprezintă un grup complex și eterogen de microorganismele monocelulare de tip eucariot (celule cu nucleu diferențiat), care se înmulțesc prin înmugurire, ca formă generală de reproducere și în mod particular prin ascospori formați pe cale asexuată și sexuată.

2.1.1. Istoric

Denumirea de „drojdie” semnifică, în general, sedimentul care se formează după ce a avut loc fermentația alcoolică a musturilor dulci. Denumirea de levuri provine de la verbul „lever” (limba franceză – a ridica) ce sugerează creșterea în volum a aluatului la fabricarea pâinii. Cunoscută din timpuri străvechi pentru activitatea lor fermentativă, drojdiile sunt studiate de Louis Pasteur (1863), studiu continuat de microbiologii: Meyen, Rees și Hansen care realizează o clasificare a drojdiilor în 1896, completată de Guillermond în 1928. Un studiu taxonomic de referință aparține lui Lodder (1952, 1970) și mai recent, lui Kreger van Rij (1984).

2.1.2. Importanță și rol

Drojdiile joacă un rol foarte important în industria alimentară, biotehnologie, în natură.

Având drept caracteristică principală capacitatea de a produce fermentarea glucidelor simple cu formare de alcool etilic și dioxid de carbon, drojdiile fermentative sunt utilizate în biotehnologii alimentare la fabricarea alcoolului, a vinului, berii și pâinii. Drojdiile au o compoziție chimică valoroasă și după cultivare în condiții de aerare și prelucrare sunt utilizate ca sursă de proteine în alimentația umană, cu denumirea de SCP (single cell protein – proteine din monocelulare) sau în alimentația animalelor, deoarece pe lângă 45-55% proteină brută/100 g s.u., aduc în rație aminoacizi (lizină etc.) și vitamine ale grupului B (tiamină și riboflavină).

În microbiologia industrială, din biomasă de drojdie se obțin:

- extracte (plasmolizate, autolizate), folosite ca aditivi alimentari sau pentru îmbogățirea în substanțe azotate a mediilor de cultură destinate fermentațiilor;
- vitamine hidrosolubile: B₁, B₂, PP, ergosterol;
- enzime: β-fructofuranozidaza și β-galactozidaza;
- prin hibridizări și inginerie genetică, din mutații ai speciei *Saccharomyces cerevisiae* s-a obținut interferonul – substanță cu efect antiviral și citostatic.

2.1.3. Răspândire în natură

Drojdiile au o largă răspândire în mediul ambiant, fiind întâlnite în toate habitaturile naturale. În sol, celulele de drojdie se întâlnesc în straturile superficiale până la adâncimi de aproximativ 30 cm, în concentrații de 10²- 2·10⁵/g. Din sol, prin acțiunea unor factori (fizici, mecanici, biologici), microorganismele se pot afla temporar în aer și să se răspândească la distanțe mari; din sol și aer drojdiile pot

ajunge în ape și unele specii pot fi întâlnite chiar la adâncimi de 4000 m. În regnul vegetal drojdiile se întâlnesc pe suprafața frunzelor, fructelor, florilor, în rădăcini. Răspândirea drojdiilor este favorizată de insecte care odată cu nectarul/sucul preiau și celulele de drojdie. O parte din drojdii supraviețuiesc iarna în tubul digestiv al insectelor, iar primăvara sunt eliminate. În regnul animal drojdiile sunt prezente în microflora intestinală și se elimină natural prin produse de defecție; în cantități mai reduse se întâlnesc în cavitatea bucală și pe piele.

2.1.4. Caractere morfologice generale

Celula de drojdie are în mod obișnuit formă sferică, ovală sau cilindrică, cu dimensiuni medii de 4-14 μm. Forma și dimensiunea celulelor este un caracter de gen și specie și acestea pot fi influențate de starea fiziologică și condițiile de cultivare. Dintre formele caracteristice unor genuri cu importanță industrială se menționează:

- forma ovală (elipsoidală) specifică drojdiilor fermentative ce aparțin genului *Saccharomyces*;
- forma sferică predomină la drojdii din genul *Torulopsis*;
- forma apiculată (de lămâie) la genurile *Kloeckera* și *Hanseniaspora*;
- forma de sticlă la drojdii din genul *Saccharomyces*.

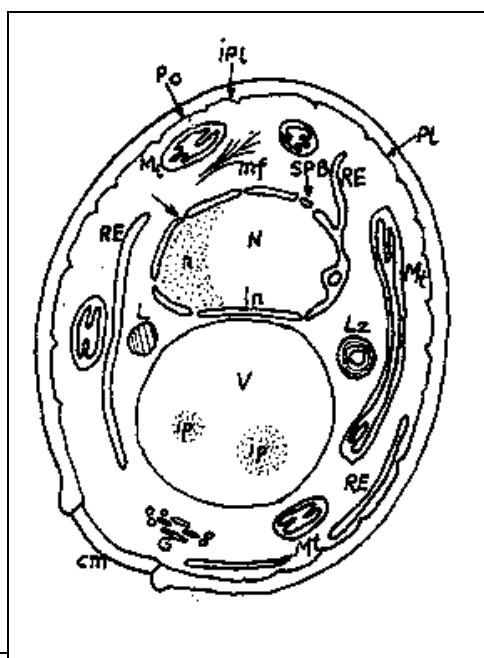
Prin cultivarea celulelor de drojdie pe medii nutritive solide sau solidificate (de exemplu: must de malț cu agar), în cazul în care la suprafață se află o celulă unică, cu caractere morfologice specifice. Coloniile de drojdii au diametrul între 0,2-2 cm au aspect cremos, lucioase sau mate, de culoare în general alb-crem; drojdii din g. *Rhodotorula* și *Sporobolomyces* formează colonii colorate în roșu-portocaliu datorită pigmentilor carotenoizi sintetizați intracelular.

În funcție de specie, colonia în secțiune poate avea un profil lenticular, semicircular sau triunghiular cu perimetrul circular, umbonat, cu margini ondulate. Caracterele morfocoloniale reprezintă criterii valoroase pentru identificarea drojdiilor.

2.1.5. Structura celulei de drojdie

Ca și celelalte celule eucariote, drojdiile au structura compusă din învelișuri celulare, citozol, nucleu, mitocondrii, ribozomi, vacuole și alte organite intracelulare.

Fig.1. Organizarea internă a celulei de drojdie:



- cm - cicatrice mugurală
- G - corp Golgi
- L - incluziuni lipidice
- Lz - lizozomi
- Mt - mitocondrie
- N - nucleu
- n - nucleol
- Pc - perete celular
- Pl - plasmalemă
- RE - reticul endoplasmatic
- V - vacuolă
- In - înveliș nuclear prevăzut cu pori
- Ipl - învaginări plasmalemale

Învelișurile celulare – **peretele celular și plasmalema** – sunt structuri ce limitează celula și determină forma de bază a acesteia și intervin în toate procesele biologice fundamentale care se desfășoară la nivel celular.

Peretele celular are o grosime cuprinsă între 150 și 250 nm și poate să reprezinte o pondere de 5÷15% din biomasa uscată a drojdiei. Din punct de vedere structural, peretele celular are aspect laminar și este alcătuit din 2÷3 straturi. Diferențiat după stadiul de dezvoltare al celulelor, peretele celular se prezintă subțire și flexibil la celulele tinere, mai gros și rigid la celulele bătrâne.

Stratul extern prezintă o suprafață rugoasă în care se observă cicatricele mugurale, rămase după desprinderea mugurilor de celula mamă. O celulă normală de *Saccharomyces cerevisiae* poate înmuguri de circa 20 de ori, așa încât înainte de a-și pierde viabilitatea aproape întreaga suprafață celulară este acoperită cu cicatrici mugurale. Din punct de vedere chimic, în componența stratului extern s-au descoperit manani, glucani și chitina, care împreună reprezintă peste 90% din substanța uscată a peretelui celular, alături de prezența unor cantități mici și variabile de lipide, enzime, cationi și apă.

Stratul intern are o suprafață ornamentată cu riduri proeminente formate din fibrile constituite din molecule liniare de β -glucan ce formează complexe cu proteinele asigurând rigiditatea sau elasticitatea peretelui celular.

La nivelul peretelui celular sunt localizate și enzime (invertaza, fosfataza, endoglucanaze, permeaze) implicate în biosinteza compușilor peretelui celular și în procese de transfer a substanțelor.

Rolul esențial al peretelui celular este cel de a asigura forma celulei și de protecție față de factorii mediului ambiant. În cooperare cu plasmalema, participă la creșterea și reproducerea celulară, în biosinteză și catabolism.

De asemenea, peretele celular este implicat în reacțiile de floclare și aglutinare ale drojdiilor, proprietăți tehnologice importante pentru drojdiile fermentative.

Prin îndepărtarea peretelui celular prin metode enzimaticе, se obțin protoplaștii folosiți în ingineria genetică pentru obținerea prin fuziune a hibridilor cu importanță practică. Prin amplasarea protoplaștilor pe mediu nutritiv în timp de 8÷12 ore are loc regenerarea peretelui celular.

Plasmalema (membrana citoplasmatică), reprezintă cel de-al doilea înveliș al celulei de drojdie ce aderă strâns pe toată suprafața sa cu peretele celular, cu care cooperează funcțional. La microscopul electronic apare ca un strat lamelar cu o grosime de circa 8÷9 nm, care delimitează protoplastul la exterior. La celulele tinere apare ca un strat omogen, neted, fără nici o învaginare, în timp ce la celulele mature în membrană se evidențiază învaginări - similare unor șanțuri care îi măresc mult suprafața.

Din punct de vedere chimic plasmalema este constituită din lipoproteine, în care lipidele reprezintă 23÷30%, iar proteinele 30÷33% din masa membranei, raportul proteine/lipide variază în funcție de specie, fenofază și procedeele de izolare utilizat, între 1,1 și 1,4. Dintre lipidele prezente în plasmalemă predomină fosfolipidele care împreună cu sterolii și acizii grași nesaturați au un rol esențial în procese de permeabilitate. Lipidele, cu rol de solvent hidrofobic, permit accesul în celulă al unor substanțe utile (aminoacizi nepolari, vitamine). Proteinele plasmaticе sunt glicoproteine ce au o mare mobilitate în plasmalemă și sub formă de molecule sau complexe moleculare îndeplinesc funcții de recepție și transport. Conform modelului stabilit de Robertson, plasmalema prezintă două straturi lipidice în care

moleculele de lipide sunt orientate cu partea hidrofobă spre interior și cu cea hidrofilă – polară spre periferie și sunt delimitate în ambele părți de macromolecule proteice; particule globulare proteice se pot evidenția și între straturile lipidice, modificându-și poziția în funcție de starea fiziologică a celulei.

Plasmalema este o structură dinamică, însușirile sale morfologice și biochimice ca și potențialul său funcțional modificându-se pregnant în funcție de stadiul ciclului celular și de influența unor factori ai mediului ambiant. În primul rând este o barieră osmotică cu permeabilitate selectivă ce reglează transferul de substanțe nutritive necesare în celulă pentru a fi metabolizate, precum și eliminarea de cataboliți, iar prin sistemele enzimactice active la acest nivel, intervine în reglarea procesului de creștere și înmulțire. Plasmalema interferează cu principalele căi metabolice ale celulei vii.

Citoplasma este constituită din citosol și din organite citoplasmatică care sunt dispersate în el. Este componenta celulară cu cel mai înalt dinamism, structura sa fizico-chimică și potențialul său fiziologic modificându-se foarte rapid, corelându-se permanent cu condițiile mediului ambiant și cu necesitățile metabolice ale diferitelor etape de dezvoltare.

Citoplasma reprezintă mai mult de jumătate din volumul total al celulei. Hialoplasma sau matricea citoplasmatică este substanța fundamentală a citoplasmei prezentă în toate celulele vii, localizată în spațiul celular în afara compartimentelor delimitate de membranele intracelulare. Ea este formată dintr-o fracție solubilă (citosol), citoschelet și o rețea de filamente care interconectează elemente de citoschelet și organitele celulare în citoplasmă (Dan, V., 1997).

Citosolul este un sistem coloidal cu un conținut de 70÷85% apă, în care substanțele componente se află sub formă de sol sau gel, formând micle coloidale. Dintre substanțele organice predomină proteinele cu rol structural sau catalitic, lipide cu rol plastic și glucide cu rol energetic. În compoziția chimică a citosolului intră și acizii nucleici (ARN și ADN), nucleosidele și nucleotidele cu implicații majore în metabolismul energetic al celulei ca și unii alcooli, fenoli, acizi organici, etc. În citosol, în anumite faze ale creșterii celulare, se pot acumula substanțe în exces sub forma unor **incluziuni de rezervă** și anume:

- **Granule de glicogen**, se prezintă sub forma unor corpusculi sferici, cu diametrul de circa 40 nm și reprezintă principala substanță de rezervă a celulei care este metabolizată când aceasta este în stare de înfometare. Se pot evidenția prin suspendarea celulelor de drojdie în soluție de Lugol, când glicogenul în prezența iodului se colorează în brun-roșcat.
- **Sferozomii (oleiozomii)** reprezintă incluziuni lipidice acumulate în faza staționară de creștere celulară delimitate de o membrană simplă, ce conțin fosfolipide și acizi grași nesaturați ce pot fi metabolizați în condiții de malnutriție, după ce se produce liza enzimatică a membranei.

Citoplasma joacă un rol important în biochimia celulei și se găsește în strânsă interdependență cu organitele pe care le înconjoară. În acest sens, primul stadiu al respirației – glicoliza – și fermentația alcoolică decurg în citoplasmă, în timp ce următorul stadiu, ciclul ATC se realizează mitocondric.

Organitele celulare. Dintre organitele celulare cu care citosolul interacționează în mod permanent formând o unitate morfofuncțională, fac parte următoarele: **nucleul, mitocondrii, aparatul Golgi, sistemul vacuolar.**

Nucleul reprezintă spațiul genetic în care are loc stocarea, replicarea și transmiterea informației celulare și poate fi secvențializat în următoarele părți: înveliș,

nucleoplasmă, cromonemată, nucleol și fus intranuclear. Are o formă sferică sau ovală, de obicei cu o poziție excentrică în citosol și prezintă o anvelopă nucleară în care s-au evidențiat pori care asigură legătura între nucleu și citosol.

Învelișul nuclear conferă individualitate nucleului prin controlul riguros și medierea schimbărilor nucleocitoplasmice. Nucleoplasma reprezintă mediul în care sunt înglobate cromonemata, nucleolul și fusul intranuclear. Nucleolul constă dintr-un miez denumit core, alcătuit din histone în formă de disc pe care sunt înfășurate segmente de ADN, formând aranjamente helicoidale sau solenoide. În nucleol sunt sintetizate proteine ribozomale și ARN ribozomal care apoi trec prin porii nucleari, în citosol. În funcție de caracterele genetice ale speciei de drojdie, numărul de cromozomi nu depășește valori de 8÷18, *Saccharomyces cerevisiae* are 17 cromozomi (Konovalov, 1980).

Mitocondriile sunt organitele de bază sau structurile subcelulare în care se sintetizează substanțele care înmagazinează energia chimică a celulei, de aceea, nu întâmplător sunt supranumite și „uzine energetice celulare”. Pot ocupa până la 25% din volumul citosolului, în număr variabil, de 10÷50/celulă, într-o continuă metamorfoză, încât în unele faze fiziologice pot forma o mitocondrie unică, ramificată denumită condriom.

Sunt organite puternic hidratate, apa reprezentând până la 70% din masa mitocondriei, ceea ce reflectă un potențial fiziologic particular. Substanța uscată este constituită în principal din proteine și lipide (peste 90%), acizi nucleici, nucleotide, ioni minerali. Proporția diferitelor componente variază considerabil în funcție de starea fiziologică a celulei și de influența unor factori de mediu. Conform ultimelor date științifice, proteinele se află repartizate în proporție de 5% în membrana externă, 20% în membrana internă și 75% în condriopasmă.

Mitocondriile posedă sisteme de transport specifice, diversificate, care realizează transportul unor metaboliți esențiali prin membranele mitocondriale ce separă condrioplasma de citosol. În mitocondrii există enzime ce realizează procese de oxidare ale compușilor organici, enzimele lanțului respirator și numeroase enzime oxidative, enzime ce asigură fosforilarea.

Reticulul endoplasmatic face legătura între nucleu și vacuom și reprezintă o rețea de vezicule, caracterizate printr-o mare plasticitate morfologică. Reticulul endoplasmatic este sediul unor complexe enzimatic (citocromoxidaza, NAD⁺, enzime ale lanțului transportor de electroni) și are rol în transportul substanțelor nutritive, în declanșarea procesului de înmugurire, în biogeneza sferozomilor, vacuolelor, corpilor Golgi; participă, de asemenea, la expansiunea învelișului nuclear și a plasmalemei în diferite etape de dezvoltare ale celulei.

Aparatul Golgi este un sistem de endomembrane, alcătuit din unități funcționale – corpi Golgi sau dictiozomi, care face legătura între reticulul endoplasmatic și plasmalemă, între reticulul endoplasmatic și alte organite celulare. Aparatul Golgi este aparatul de sortare și dirijare a proteinelor și componentelor membranare spre locul de destinație; au rol în expansiunea peretelui celular (Dan, V., 1999).

Ribozomii denumiți și **granule Palade** după numele cercetătorului de origine română care i-a pus în evidență în anul 1953, sunt particule nucleoproteice implicate în sinteza proteinelor celulare răspândiți în citosol – citoribozomi, liberi sau în asociații de 5÷6 polizomi. Au în structură ARN – ribozomal și proteine (în cazul ribozomilor de *Sachharomyces cerevisiae* valoarea raportului ARN/proteine variază

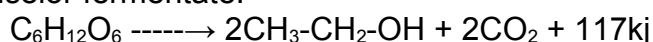
între 1,04 și 1,12. ARN ribozomal este implicat în procese de transcripție a informației genetice pentru biosinteza proteinelor/enzimelor, necesare celulei.

Lizozomii sunt structuri veziculare bogate în enzime: proteaze, fosfataze, lipaze (peste 40 de tipuri de enzime), active la pH = 5 cu rol în digestia unor compuși ai celulei vii, care nu mai funcționează eficient; în exteriorul lizozomului, în citosol, enzimele nu sunt active deoarece pH-ul este de 7,3. Enzimele lizozomale sunt în mod normal inactive, latența lor este dependentă de integritatea membranei lizozomale, care acționează ca o barieră ce se interpune între enzimă și substrat. Când sub acțiunea unor factori, de exemplu în starea de înfometare, în absența apei care să asigure transportul în exteriorul celulei a cataboliților formați, pH-ul în citosol scade, enzimele din lizozomi sunt activate și celula moare prin autoliză.

Peroxizomii sunt structuri sferice sau ovale înconjurate de o membrană simplă și cu o matrice fin granulată pe care sunt localizate oxidaze, cu rol în adaptarea celulei de drojdie la condiții aerobe și intervin în degradarea acizilor grași, a aminoacizilor, a apei oxigenate și a altor substanțe (de ex. a metanolului).

2.1.6. Caractere fiziologice generale ale drojdiilor

O proprietate importantă a unor drojdii cu utilizări în industria alimentară este aceea de a fermenta în condiții de anaerobioză glucide (hexoze, diglucie, triglucide) cu formare de alcool etilic și dioxid de carbon și produse secundare care dau aroma caracteristică produselor fermentate:



În condiții de aerobioză, drojdiile asimilează glucidele transformându-le prin respirație la CO₂ și H₂O, iar energia eliberată favorizează creșterea și înmulțirea celulelor:



Celulele de drojdie reacționează activ la presiunea osmotică dată de concentrația substanțelor dizolvate în mediul în care se află suspendate. Dacă mediul este hipotonic, cu o concentrație a substanțelor dizolvate mai mică decât concentrația intracelulară, apa va pătrunde în celula care își mărește volumul și dacă se prelungește această stare de turgescență, celula suferă deteriorări fizice ireversibile. În mediu hipertonic, când concentrația mediului este superioară concentrației intracelulare, apa din celulă difuzează în exterior pentru a asigura izotonia, iar celula trece în starea de **plasmoliză** (Dan, V., 1999).

Celulele de drojdie, în funcție de condițiile de cultivare și vârstă pot prezenta activitate metabolică diferențiată concretizată prin trei stări în care se pot afla celulele și anume:

- **starea de metabioză (activă)**, în care celulele au activitate metabolică maximă. În condiții favorabile de cultură, celulele cresc, se reproduc și acumulează intracelular substanțe de rezervă glicogen și trehaloză;
- **starea de anabioză (latentă)**, celulele își mențin caracteristicile vitale, dar nu se pot înmulți. Această stare apare când substanțele nutritive ale mediului sunt epuizate, iar celulele consumă din substanțele de rezervă intracelulare;
- **starea de autoliză (moartea fiziologică)**. Se produce o solubilizare a compușilor intracelulari sub acțiunea enzimelor proprii celulei.

2.1.7. Reproducerea drojdiilor

Forma generală de reproducere a drojdiilor este înmugurirea vegetativă (calea asexuată) care are la bază un proces simplificat de mitoză, când din celula mamă se formează noua celulă, identică din punct de vedere genetic.

Unele drojdii au capacitatea de a se înmulți prin sporulare, ce poate avea loc pe cale asexuată (prin procesul de meioză) și pe cale sexuată (prin procese de copulare). Sporularea este condiționată genetic are loc în anumite condiții de mediu.

Reproducerea prin înmugurire. Înmugurirea are loc când drojdiile se află în condiții optime de mediu (nutrienți, pH, temperatură). O condiție necesară pentru înmugurire este aerarea corespunzătoare a mediului, deoarece în prezența oxigenului din aer are loc asimilarea eficientă a nutrienților cu recuperarea energiei potențiale a acestora, energie folosită de celulă în creștere pentru procese de biosinteză, consumatoare de energie. În aceste condiții, în prima etapă celula de drojdie crește în dimensiuni în urma creșterii coordonate a compușilor intracelulari; creșterea în volum fiind mai rapidă decât a suprafeței învelișurilor celulare, are loc o înmuiere enzimatică a peretelui și apare o protuberanță - mugurele. Între celula parentală și mugure se perfectează un canal - diverticulum prin care se transferă în celula nou formată material nuclear și citoplasmatic (cariokineză și citokineză). Când celula fiică va conține toate componentele și organelle necesare unei vieți independente, la nivelul canalului se formează un perete inelar cu o concentrație ridicată în chitină, ce se dezvoltă centripet până are loc obturarea și separarea (Dan, V., 1999).

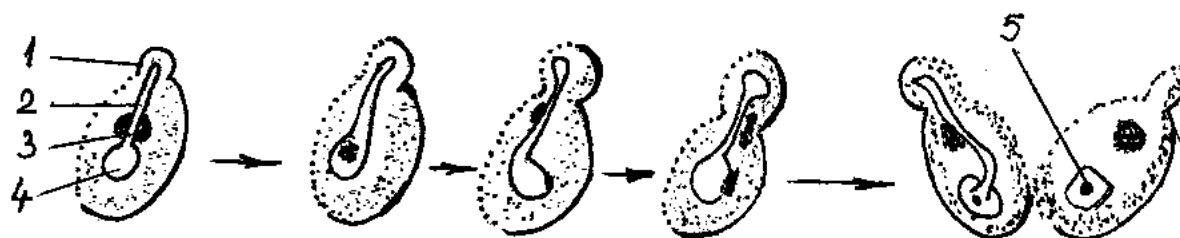


Fig. 2. Înmugurirea la drojdii:

1- mugure; 2- canal de legătură; 3- nucleu; 4- vacuolă adiacentă nucleului; 5- nucleol.

Celula fiică, cu activitate metabolică independentă, poate rămâne atașată de celula mamă formând asociații sau pseudomicelii, sau se separă de celula parentală, iar la locul de desprindere rămâne vizibilă cicatricea mugurală. În condiții optime de viață, o celulă de drojdie poate forma 9÷42 noi celule apoi celula moare din punct de vedere fiziologic.

Reproducerea prin sporulare. Sporularea are la bază procesul de meioză, prin care numărul de cromozomi ai celulei parentale diploide se reduce la jumătate, iar celulele formate primind un singur rând de cromozomi sunt haploide.

Sporularea este inițiată după circa 10 ore de expunere pe mediul de sporulare și este mai intensă după 24÷48 ore. În timp, celula generatoare de spori denumită și asc se poate rupe sau să se solubilizeze prin autoliză și ascosporii liberi, în condiții favorabile germinează și formează prin reproducere vegetativă clone haploide. Ascosporii haploizi pot fi de tip "a" sau "α" în funcție de natura feromonilor specifici; în condiții favorabile, celulele ajunse la maturitate fiziologică denumite și gametei pot să fuzioneze printr-un proces de conjugare pentru a forma din nou celule diploide. Dacă

are loc conjugarea între celule de același tip "a" sau "α" celulele diploide sunt viabile, dar ascosporii formați își pierd această calitate.

Sub formă de ascospori drojdiile rezistă timp îndelungat în sol, în condiții de uscăciune, în schimb termorezistența lor este apropiată de cea a celulelor vegetative (inactivare la 75÷85°C).

Meioza este importantă din punct de vedere practic pentru că se pot realiza copulări dirijate cu obținerea unor hibridi ce prezintă proprietăți superioare preluând de la celulele parentale caractere deosebite (Dan, V., 1999).

2.1.8. Clasificarea generală a drojdiilor

Potrivit Codului Internațional de Nomenclatură Botanică tulpinile de drojdii sunt grupate în specii, speciile în genuri, iar genurile în subfamilii și familii.

O clasificare de referință este cea propusă de Lodder și Kreger van Rij (1952) care clasifică drojdiile în 38 genuri și 349 de specii de drojdii, iar clasificarea cea mai recentă și cuprinzătoare aparține lui Kreger van Rij (1984) (60 genuri cu aproximativ 500 de specii).

Din această clasificare se vor menționa genuri și specii cu implicații în industria alimentară, în calitatea lor de agenți ai fermentației alcoolice sau de alterare a produselor alimentare.

Genul *Saccharomyces* cuprinde 45 de specii cu activitate predominant fermentativă. Se înmulțesc prin înmugurire și sporulare, producând 1-4 ascospori. Dintre speciile reprezentative ale genului:

Saccharomyces cerevisiae este o drojdie de fermentație superioară folosită la fabricarea alcoolului și la obținerea drojdiei de panificație. Din biomasa de celule obținută în mediul nutritiv și în condiții de aerare, prin procedee biotehnologice se pot obține enzime (invertază), vitamine din grupul B, interferon ș.a.

Saccharomyces carlsbergensis este o drojdie de fermentație inferioară, se utilizează industrial la fabricarea berii, iar din drojdia reziduală rezultată după fermentare se pot obține extracte, substanțe de aromă.

Genul *Brettanomyces* cuprinde drojdii de formă oval cilindrică, în aerobioză pot să producă prin fermentarea lentă a glucozei, alcool etilic 11-12% alcool, acid acetic, citric, lactic, succinic. Dau alterări ale berii, vinului (tulburare, iz de șoarece) cu formare de esteri și substanțe cu gust amar, a băuturilor nealcoolice, a murăturilor.

Genul *Candida* este un gen bogat în specii (81), eterogen din punct de vedere morfologic și fiziologic și care a suferit în timp multe modificări taxonomice. *Candida mycoderma* denumită și floarea vinului se dezvoltă în prezența aerului la suprafața lichidelor slab alcoolice formând un voal caracteristic; prin oxidarea alcoolului la dioxid de carbon și apă are loc deprecierea vinului, berii. Alte specii *Candida utilis*, *Candida robusta*, *Candida tropicalis*, *Candida lypolitica* etc. se pot cultiva pe medii obținute prin prelucrarea unor deșeuri ale industriei alimentare, a lemnului și celulozei, obținându-se o biomasă, cu un conținut de 45-55% proteină, folosită în furajarea animalelor. *Candida kefyri* este utilă la fabricarea chefirului, *Candida albicans*, drojdie facultativ patogenă nu se înmulțește în alimente.

Genul *Debaryomyces* cuprinde drojdii de formă oval cilindrică, poate produce mucus la suprafața batoanelor de salam, se dezvoltă la suprafața brânzeturilor, iaurtului și dau alterări ale sucurilor concentrate de portocale.

Genul *Hanseniaspora* include drojdii cu proprietăți fermentative reduse (5° alcool), cu formă apiculată și sunt răspândite în microbiota fructelor citrice, a

smochinelor; intervin în fermentarea naturală a boabelor de cacao. *Hanseniaspora apiculata* poate reprezenta până la 90% din microbiota mustului și își reduce viteza de fermentare la acumularea de 5-7% alcool. Se poate dezvolta în vin fiind responsabilă pentru formarea de acizi volatili, esteri care dau un gust amar, străin vinului. Prin contaminarea vinului folosit la obținerea șampaniei la sticle, *Hanseniaspora apiculata* poate forma un sediment aderent la sticlă și care se îndepărtează greu la degorjare.

Genul *Pichia* conține 35 de specii. Au o slabă activitate fermentativă, sunt drojdii peliculare; prin dezvoltare și formare de voal produc deprecierea vinului, a berii. Se pot izola de pe suprafața peștilor și a creveților, din saramura măslinelor conservate și pot produce alterări ale produselor vegetale murate.

Genul *Rhodotorula* include celule cu formă oval-cilindrică, sunt drojdii oxidative și pot sintetiza pigmenți carotenoizi care imprimă coloniei culoarea roșu-cărămiziu. *Rhodotorula glutinis* și *Rhodotorula mucilaginosa*, predominante pe alimente: pui, pește, creveți, pe suprafața untului, sunt specii psihrotrofe.

Genul *Saccharomyces* cu specia *Saccharomyces ludwigii* prezintă forme apiculate sau oval alungite, poate fi agent de alterare a musturilor și sucurilor de fructe și dau tulburarea cidrului, a vinurilor semidulci.

Genul *Saccharomycopsis* cu specia importantă *Saccharomycopsis fibuligera* prezintă celule ovale, fermentează lent glucoza, zaharoza, maltoza, asimilează amidon, alcool etilic, acid lactic etc.; unele tulpini sunt folosite pentru producerea de glucoamilază sau pentru obținerea de drojdii furajere.

Genul *Schizosaccharomyces* cuprinde drojdii de formă cilindrică, ovală. *Schizosaccharomyces pombe* este agent al fermentării sucului de trestie de zahăr și folosită pentru obținerea romului și a băuturii arak.

Genul *Torulopsis* prezintă celule sferice, ovale sau cilindrice. Specii ale genului întâlnite în mustul de struguri, au putere alcooligenă redusă. Sunt osmotolerante, psihrofile, sulfitorozistente. Pot produce alterări ale laptelui concentrat, a siropurilor, a sucurilor.

Genul *Zygosaccharomyces* cuprinde drojdii cu celule ovale, cu proprietăți fermentative, osmotolerante. Pot produce fermentarea mierii, a siropurilor concentrate de zahăr cu formare de alcool etilic, acid acetic, dioxid de carbon.

2.2. MUCEGAIURI (FUNGI FILAMENTOȘI, MICROMICETE)

Mucegaiurile sunt microorganisme de tip eucariot, monocelulare sau pluricelulare, diferențiate din punct de vedere morfologic și care se reproduc prin spori formați numai pe cale asexuată sau pe cale mixtă (asexuată și sexuată).

2.2.1. Răspândire și rol

Mucegaiurile sunt foarte răspândite în natură, habitatul preferat și cel mai populat este solul, în special în stratul superficial al solului care le asigură condiții de creștere și supraviețuire. Prin activitatea lor de degradare a materiei organice vii, mucegaiurile participă la transformarea unor compuși organici (celuloza, hemiceluloze, substanțe pectice, amidon, lipide) la compuși mai simpli și sunt considerați agenți de putrezire. Mucegaiurile participă astfel la circuitul carbonului în natură și îmbogățesc solul în substanțe cu molecule mici care pot fi folosite de alte microorganisme sau de către plante. Din sol, prin intermediul factorilor naturali, spori

de mucegai sunt antrenați pe calea aerului la distanțe foarte mari, ceea ce asigură răspândirea nelimitată de granițe geografice. În aer, mucegaiurile sub formă de spori sau hife vegetative pot supraviețui un timp îndelungat, iar în absența curenților de aer se depun cu o viteză ce atinge valori de 3 cm/sec.

În apă prezența mucegaiurilor este ocazională, apa fiind un mediu prin care se poate face răspândirea sporilor. Creșterea mucegaiurilor în apă este dependentă de conținutul acestora în compuși organici și poate avea loc numai în condiții de aerare.

Sporii de mucegai se întâlnesc frecvent la suprafața plantelor, în tractul digestiv, în special la ierbivore.

În industria alimentară activitatea de biodeteriorare este nedorită deoarece fungii cauzează pierderi prin mucegăirea semințelor alimentelor. Ca efect secundar este formarea de micotoxine, de către unele mucegaiuri, încât alimentele devin inutilizabile.

În afara mucegaiurilor saprofite – agenți ai putrezirii, se întâlnesc mucegaiuri patogene care pot parazita: plante, animale, pești și insecte. Mucegaiurile sunt frecvent întâlnite în microbiota plantelor, pe suprafața fructelor și legumelor. Dacă produc îmbolnăviri la plante poartă denumirea de mucegaiuri fitopatogene și sunt responsabile pentru aproximativ 70% din totalul îmbolnăvirilor întâlnite la cereale și legume. Dintre mucegaiurile fitopatogene se pot enumera cele care produc boli ca mătura, rugina, tăciunele etc. ale plantelor industriale.

La om și animale mucegaiurile patogene produc un număr mai redus de îmbolnăviri, se dezvoltă pe piele, unghii, păr. Un număr mic de mucegaiuri pot produce îmbolnăviri interne atunci când sporii sunt inhalați (pe cale respiratorie) dând micoze (de exemplu, *Aspergillus fumigatus* produce aspergillom pulmonar).

2.2.2. Rolul mucegaiurilor în industrie

În afară de rolul important al mucegaiurilor în natură, în industria alimentară, culturi fungice selecționate se pot folosi la fabricarea brânzeturilor – tip Roqueforti, Camemberti sau la maturarea salamurilor crude.

Cu ajutorul mucegaiurilor pe cale biotehnologică se pot obține compuși deosebit de valoroși:

- **antibiotice:** peniciline cu *Penicillium chrysogenum*, cephalosporine (*Cephalosporium*), griseofulvine (*Penicillium griseofulvum*) acidul fusidic cu *Fusidium coccinenum* și antibiotice active față de bacterii Gram pozitive cu *Mucor ramannianus*;
- **acizi organici (citric, lactic, gluconic, kojic, malic, fumaric);**
- **vitamine (B₂, ergosterol – provitamina D₂);**
- **enzime (amilaze, proteaze, lipaze, celulaze etc.).**

Mucegaiurile se mai pot folosi pentru îmbogățirea în proteine a făinurilor vegetale și ca agenți de depoluare a apelor reziduale.

În tehnologiile moderne se obțin SCP cu fungi din care: *Fusarium graminearum* în Marea Britanie și specii de *Paecilomyces* în procesul Pekilo în Finlanda unde sunt cultivate pe leșii sulfitice și deșeuri din industria hârtiei.

2.2.3. Caractere morfologice

Mucegaiurile se răspândesc în natură sub formă de spori rezistenți la uscăciune, formă în care se mențin în stare viabilă ani de zile. Dacă un astfel de spor ajunge pe suprafața unui mediu favorabil pentru creștere, cu o cantitate suficientă de apă liberă care să-i permită absorbția substanțelor nutritive, în primul stadiu care

poate să dureze 3-4 ore, are loc absorbția apei și activizarea sistemelor enzimatic, apoi are loc germinarea celulei sporale și formarea tuburilor vegetative numite hife sau thal. Hifele cresc numai prin vârf și deci au o creștere apicală, după care se ramifică.

Hifele se extind pe suprafața mediului, se diversifică și îndeplinesc anumite funcții specializate. Hifele de extindere se pot dezvolta și în profunzimea mediului realizând absorbția nutrienților și au rol în susținere; hifele de răspândire se pot dezvolta de-a lungul mediului sau aerian. La un anumit grad de dezvoltare a acestor hife vegetative se formează hifele reproducătoare, generatoare de spori, diferențiate în funcție de gen și specie. Totalitatea hifelor vegetative și reproducătoare alcătuiește miceliul.

Dezvoltarea mucegaiurilor are loc destul de rapid în condiții favorabile, astfel în interval de 2-3 zile pe mediu nutritiv se formează colonii vizibile diferențiate.

În cazul mucegaiurilor inferioare caracterizate prin miceliu aseptat, coloniile se dezvoltă rapid, sunt extinse, cu tendința de a ocupa tot spațiul disponibil, au aspect păslos și culori alb, bej, cenușiu, brun.

Mucegaiurile superioare caracterizate prin miceliu septat formează colonii cu o creștere radială limitată și culoare ce diferă de la alb la galben, brun, verde, portocaliu, albastru, cu diferite nuanțe specifice în funcție de gen și specie.

Când spori de mucegai ajung la suprafața unui mediu nutritiv lichid, prin întrepătrunderea hifelor vegetative se formează o peliculă denumită dermă, la început netedă, în timp, prin creșterea suprafeței derma se cutează și la suprafață se dezvoltă hifele reproducătoare, se produce sporularea și colorarea specifică. Prin introducerea sporilor de mucegai în mediu lichid și cultivarea pe agitator rotativ, ca rezultat al agitării, mucegaiurile formează prin creștere vegetativă, sfere vizibile, întotdeauna de culoare albă.

2.2.4. Structura mucegaiurilor

Mucegaiurile au la bază celula de tip eucariot ce include toate organele descrise la celula de drojdie. Spre deosebire de drojdia, peretele celular este mai gros și în afară de α și β -glucani se găsește în cantitate mare celuloza. Celula poate conține 1-2 nucleu cu câte 2-4 cromozomi fiecare. În funcție de caracterele genetice pot fi:

- **mucegaiuri inferioare** – sunt monocelulare și se dezvoltă sub forma unei celule gigantice ce prezintă mai multe ramuri. În aceste celule migrează liber nucleii citoplasmatici și organele intracelulare. În cazul în care un spor ajunge pe un mediu nutritiv, atunci prin creștere are loc germinarea sporului care constă într-o creștere în volum a acestuia producându-se hife vegetative. Prima dată se formează hife de extindere care se dezvoltă în paralel de-a lungul mediului nutritiv. Se formează apoi hife submerse ce se dezvoltă în profunzimea mediului realizând absorbția nutrienților și au rol de susținere. Totalitatea acestor hife de extindere și submerse formează miceliul vegetativ. Odată cu creșterea și dezvoltarea miceliului vegetativ încep să apară hife aeriene care sunt și reproducătoare;
- **mucegaiuri superioare** sunt pluricelulare și au miceliu septat, aceasta pentru că la anumite distanțe apar pereți despărțitori (septum) prevăzută cu un por central prin care se poate face transfer citoplasmatic.

2.2.5. Caractere fiziologice generale

Mucegaiurile sunt microorganisme ușor adaptabile, deoarece au capacitatea de a forma enzime induse în funcție de natura substratului pe care se află, încât produc degradarea atât a produselor alimentare cât și a fibrelor textile, a cauciucului, betonului etc.

Mucegaiurile sub formă de hife sau spori sunt foarte rezistente la uscăciune și se mențin în stare latentă de viață un timp îndelungat.

Mucegaiurile sunt puțin pretențioase la cantitatea de apă liberă prezentă în produs, de aceea ele pot produce mucegăirea produselor care se conservă prin uscare numai când acestea încep să absoarbă apă din mediul ambiant.

În raport cu oxigenul, mucegaiurile sunt microorganisme aerobe deci necesită pentru creștere prezența oxigenului din aer sau a oxigenului dizolvat în mediul lichid.

Mucegaiurile se pot dezvolta în limite largi de pH (1,5÷9) cu o valoare optimă în domeniul acid (pH = 5,5÷6).

Mucegaiurile sunt microorganisme mezofile cu temperaturi optime de creștere la 25°C, un număr restrâns sunt termofile – cele patogene au temperatura optimă la 37°C, iar altele sunt adaptate la temperaturi scăzute (0÷3°C). Rezistența termică a mucegaiurilor sub formă de hife sau spori este mică, majoritatea sunt inactivate la temperaturi de 80°C, cei mai rezistenți spori sunt distruși la 88°C în 10 minute.

2.2.6. Reproducerea mucegaiurilor

Mucegaiurile se înmulțesc pe cale vegetativă și prin sporulare.

Reproducerea vegetativă se realizează prin intermediul fragmentelor de hife rupte sub acțiunea unor factori mecanici atunci când acestea conțin cel puțin o celulă. Fragmentele hifale chiar când, de exemplu în cazul mucegaiurilor superioare conțin mai multe celule, vor forma o singură colonie. Din acest motiv la determinarea numărului de mucegaiuri din diferite produse exprimarea se face în unități formatoare de colonii (UFC).

Fungii filamentoși pot să crească în dimensiuni fără să modifice raportul între volumul de citoplasmă și suprafața hifelor, astfel încât schimbul de substanțe între miceliu și mediu implică transport numai pe distanțe scurte.

Se cunosc 3 mecanisme prin care are loc reglarea creșterii miceliului și anume: prin reglarea extinderii hifelor, prin inițierea de ramificații și prin distribuția spațială a hifelor. Timpul de dublare a miceliului ca și intervalul între cicluri succesive de formare a septumului depind de specie și condiții de cultură și poate dura aproximativ 2 ore (*Aspergillus nidulans*). Se apreciază că, pentru mitoză completă a nucleilor la mucegaiuri sunt suficiente 10 minute, iar intervalul între mitoză și apariția septurilor este de 20÷40 minute.

Reproducerea prin sporulare. Este forma cea mai răspândită la mucegaiuri și poate avea loc pe cale asexuată sau pe cale mixtă.

2.2.7. Clasificarea generală a mucegaiurilor

Mucegaiurile reprezintă un grup taxonomic complex, motiv pentru care clasificarea acestora este în continuă transformare. Numărul posibil de specii ce ar putea exista în natură este apreciat la aproximativ 250000. Mucegaiurile de interes alimentar sunt grupate în 20 de genuri și aproximativ 1000 de specii. Clasificarea are la bază anumite criterii morfologice, structură, caractere coloniale, pigmentogeneză, integrate cu date fiziologice și genetice.

Mucegaiurile fac parte din diviziunea **EUMYCOTA** cu următoarele subdiviziuni:

1. **MASTIGOMYCOTINA** – cuprinde mucegaiuri inferioare cu miceliu aseptat care se reproduc prin oospori, pe cale sexuată, cu următoarele genuri: **Genul *Peronospora*** – cu specii fitopatogene, produc mană viței de vie. **Genul *Phytium*** – include agenți ce produc putrezirea plantelor de grâu tinere. **Genul *Phytophthora*** – cu specia *Phytophthora infestans*, agentul producător al manei la cartofi.

2. **ZYGOMYCOTINA** – cuprinde mucegaiuri inferioare cu miceliu aseptat care se reproduc prin zigospori pe cale sexuată și prin sporangiospori și chlamidospori pe cale asexuată.

Genul *Mucor* (88 specii) – se caracterizează prin formarea de sporangiospori în stilosporange, la maturitate prin ruperea membranei și eliberarea sporilor rămâne la baza columelei, un collar. În funcție de specie, columela poate avea dimensiuni și forme diferite. Dintre speciile mai importante ale genului: *Mucor mucedo*, denumit și mucegaiul alb al pâinii, *Mucor racemosus*, agent de putrezire a fructelor și legumelor, *Mucor pussillus* și *Mucor miehei*, specii selecționate pentru obținerea de proteaze cu acțiune similară cu cea a cheagului animal.

Genul *Rhizopus* (11 specii) se caracterizează prin stilosporange de dimensiuni mari, cu columelă semisferică, fără collar după ruperea membranei sporangelui. Sporangiosporii se dezvoltă în mănunchi dintr-un punct în care se dezvoltă rhizoizi - hife de susținere cu rol absorbant. Extinderea coloniei are loc rapid ca urmare a formării unor lăstari micelieni denumiți stoloni. Specia cea mai răspândită pe toate produsele alimentare este *Rhizopus stolonifer*, agent de mucegăire a fructelor și legumelor. Tulpini selecționate pot fi folosite pentru obținerea pe cale fermentativă a acidului fumaric.

Genul *Thamnidium* – se caracterizează prin formarea de sporangiofori terminați cu un stilosporange mare sub care se dezvoltă sporangiofori scurți purtători de sporangiole cu un număr mic de sporangiospori. *Thamnidium elegans* produce mucegăirea produselor conservate prin refrigerare.

Genul *Absidia* prezintă sporangi mici cu columelă de formă conică. Unele specii sunt termofile și produc îmbolnăviri la animale și om. Poate produce mucegăirea porumbului și elaborează toxine.

3. **ASCOMYCOTINA** cuprinde mucegaiuri superioare cu miceliu septat care se reproduc pe cale asexuată și sexuat prin ascospori.

Genul *Byssochlamys* produce asci cu 8 ascospori termorezistenți și produc alterarea alimentelor conservate cu acizi. *Byssochlamys fulva* și *Byssochlamys nivea* produc alterarea conservelor de fructe.

Genul *Monascus* cu specia *Monascus ruber* este folosit pentru obținerea de coloranți roșii de uz alimentar.

4. **BASIDIOMYCOTINA** cuprinde mucegaiuri superioare cu ciclul de viață mai evoluat și care se reproduc pe cale sexuată prin bazidiospori.

Genul *Puccinia* cuprinde specii fitopatogene agenți ai ruginii cerealelor.

Genul *Ustilago* produc la grâu și porumb boala denumită popular tăciune.

5. **DEUTEROMYCOTINA** cuprinde numeroase genuri și specii de mucegaiuri superioare care se reproduc prin conidiospori și la care nu există cale sexuată de sporulare sau aceasta nu a fost încă evidențiată.

Genul *Aspergillus* (132 specii) cuprinde numeroase specii cu importanță biotehnologică. Se caracterizează prin formarea de conidiofori drepecți, neramificați care poartă capul conidial alcătuit dintr-un suport anatomic denumit veziculă pe care

se dezvoltă celulele conidiogene – respectiv fialide, generatoare de lanțuri lungi de fialospori. Specia *Aspergillus niger* formează colonii radiale de culoare brun-negru, prezintă două rânduri de fialide pe toată suprafața veziculei, capul conidial este sferic. Numeroase tulpini selecționate sunt folosite pentru obținerea de enzime: amidaze, proteaze, glucozoxidaze, invertaze, enzime pectolitice sau pentru obținerea acizilor organici: acid citric, acid lactic, gluconic. Specia *Aspergillus oryzae* formează colonii de culoare bej-oranj cu conidiofori drepți și cap conidial sferic cu un singur rând de fialide. Este numit pe drept cuvânt „arsenalul enzimelor” deoarece se cunosc peste 200 de enzime elaborate de mușegai și obținute în stare purificată. Pentru obținerea de amidaze mai pot fi folosite speciile *Aspergillus awamori*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus usamii*, *Aspergillus cinnamomeus*. *Aspergillus flavus* formează colonii de culoare alb-gălbui la maturitate galben-verzui spre brun cu revers colorat în galben brun. Este răspândit în sol, pe produse vegetale și are capacitatea de a produce aflatoxine, micotoxine cu efect cancerigen.

Genul *Penicillium* (453 specii) se caracterizează prin formarea unui aparat reproducător ramificat alcătuit din ram, metule, fialide și fialospori cu diferențieri morfologice în funcție de specie. În cadrul genului, specii selecționate sunt folosite la obținerea brânzeturilor cu pastă albastră – *Penicillium roqueforti*, a brânzeturilor cu pastă moale – *Penicillium camemberti*, la maturarea salamurilor crude uscate – *Penicillium nalgiovense*. Pentru obținerea de antibiotice din grupa penicilinelor se folosesc tulpini de *Penicillium notatum* și *Penicillium chrysogenum*. Numeroase specii sunt agenți de putrezire și pot produce micotoxine: *Penicillium expansum*, *Penicillium islandicum*, *Penicillium citrinum* etc.

Genul *Botrytis* formează colonii extinse, păsloase, de culoare cenușie. *Botrytis cinerea* este denumit mușegaiul cenușiu și poate produce putrezirea vulgară sau nobilă a strugurilor. Specii fitopatogene dau boli la floarea soarelui și alterări în depozit ale fructelor și legumelor.

Genul *Fusarium* include specii saprofite răspândite în sol și specii patogene parazite ale plantelor superioare. Dau putrezirea brună a fructelor citrice, putrezirea umedă a smochinelor, mușegăirea cerealelor (orz, grâu) cu producerea de micotoxine – trichothecene: *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium nivale* etc.

Genul *Cladosporium* formează colonii cu aspect catifelat de culoare brun-oliv cu revers colorat în bleumarin-negru. Se reproduc prin blastospori în formă de lămâie. Este prezent în microbiota cerealelor proaspăt recoltate. Este agent al putrezirii negre a strugurilor și pepenilor galbeni.

Genul *Alternaria* formează colonii pufoase cu miceliu septat și conidii mari cu septumuri longitudinale și transversale. Dau putrezirea brună a fructelor. Este considerat mușegai de câmp și este prezent pe suprafața semințelor proaspăt recoltate fiind folosit ca indice de prospețime a cerealelor.

Genul *Geotrichum* formează colonii extinse, catifelte de culoare albă. Produce miceliu septat din care se separă arthrospori ce au tendința de aranjare în zig-zag. *Geotrichum candidum* este întâlnit în industria laptelui și la fabricarea pastei de tomate, drept contaminant al utilajelor.

Genul *Trichoderma* formează colonii extinse pufoase sau pulverulente de culoare gălbui spre verde. *Trichoderma reesei* produce activ celulozaze și un antibiotic gliotoxina cu efect fungistatic față de mușegaiuri care produc putrezirea lemnului.

Genul *Trichothecium* formează colonii cu aspect pufos de culoare roz-portocaliu. Dintre cele 4 specii ale genului *Trichothecium roseum* este cel mai întâlnit

pe reziduuri vegetale, ca agent al putrezirii fructelor. Este întâlnit pe suprafața boabelor de cereale: grâu, orz, porumb și poate produce mucegăirea pâinii.

2.3. BACTERII

Bacteriile sunt microorganisme monocelulare de tip procariot cu un cromozom unic, cu dimensiuni medii între 0,5-0,8 μm , care se înmulțesc asexuat prin sciziune binară, izomorfă.

Bacteriile sunt microorganisme cu o largă răspândire în natură, ca rezultat al adaptării lor în cursul procesului de evoluție. Rezervorul natural al bacteriilor este solul unde concentrația de celule poate ajunge la valori de 10^7 - 10^9 g^{-1} atât în straturile superficiale (bacterii aerobe), cât și în straturile de profunzime (bacterii anaerobe). Din sol, bacteriile s-au adaptat să trăiască în ape, unde concentrația de celule poate fi între $10/\text{cm}^3$ în apa de izvor, până la valori de $10^{12}/\text{cm}^3$, de exemplu, în ape fecalo-menajere.

Bacteriile se pot întâlni la adâncimi mari în apa mărilor și oceanelor, în ape termale. Existența în aer a bacteriilor este temporară și prin intermediul curenților de aer sunt răspândite la distanțe foarte mari. Din aer, sunt antrenate din nou în sol prin intermediul precipitațiilor atmosferice.

Bacteriile pot avea forme extrem de diferite. Astfel pot avea formă sferică (coci), de virgulă (vibrioni), de bastonași (bacili), sau de spirală (spirili).

Rolul bacteriilor în natură și industrie. Bacteriile au un rol imens în transformarea compușilor macromoleculari în compuși simpli, prin mineralizarea materiei organice nevii, contribuind astfel la realizarea naturală a circuitului unor elemente de importanță vitală: carbon, azot, sulf, fosfor, fier ș.a. Fără activitatea bacteriilor agenți ai putrefacției – “pământul s-ar transforma treptat într-un uriaș cimitir”.

În industria alimentară **bacteriile lactice** sunt folosite la fabricarea produselor lactate, a brânzeturilor, în industria panificației, la conservarea legumelor, măslinelor, furajelor verzi etc., **bacteriile propionice** sunt utilizate la fabricarea brânzeturilor tip schwaitzer, iar **bacteriile acetice** la fermentația alcoolului etilic – obținerea industrială a oțetului.

Pe căi biotehnologice s-au obținut cu ajutorul bacteriilor:

- enzime, proteine, aminoacizi, acid lactic, acid acetic, solvenți (acetona, alcool izopropilic, alcool butilic);
- hormoni – insulina produsă de un mutant de *Escherichia coli*;
- îngrășăminte biologice – *Azotobacter*;
- insecticide biologice – *Bacillus thuringiensis*;
- antibiotice – *Streptomyces sp.*
- vitamine – de ex. vitamina B12 – *Propionibacterium shermani*

Ca aspecte negative putem aminti:

- în industria alimentară – bacterii agenți de alterare a produselor alimentare (acrirea berii, vinului, putrefacția cărnii ș.a.);
 - bacterii patogene – ingerare alimente contaminate – toxiinfecții alimentare;
 - bacterii patogene – pot să paraziteze organismele vii dând îmbolnăviri grave (tuberculoza, febra tifoidă, dizenteria, sifilis, bruceloza, antrax, ș.a.), bacterioze la plante.
-

Structura celulei bacteriene. Peretele celular. Fiecare bacterie este acoperită de un rigid perete celular, care este alcătuit din peptidoglican. Peretele celular bacterian este considerat de mulți un adevărat biopolimer. Acest perete îi dă celulei o formă și înconjoară membrana citoplasmică, protejând-o de mediul înconjurător. Peretele celular bacterian de asemenea menține integritatea celulară. Acesta este atât de puternic, încât împiedică celula bacteriană să explodeze, atunci când presiunea osmotică dintre citoplasmă și mediu este prea mare. Compoziția peretelui celular diferă de la o celulă la alta, astfel alcătuind un factor important în analiza și diferențierea celulelor bacteriene. Astfel, în 1884, Hans Christian Gram, un fizician danez, a realizat o metodă de a diferenția structurile peretelui celular. Peretele celular gram pozitiv se colorează în violet prin tehnica Gram. Este gros, dar simplu structurat, unitatea de bază fiind peptidoglicanul, format din unități repetitive. Mureina este structura rezultată din unitățile de peptidoglicani cu ajutorul unei enzime: transpeptida. Are rolul de a menține forma bacteriei (la presiuni de 2-2,5 atmosfere) în cazul în care bacteria își pierde peretele sub acțiunea penicilinei. Sferoplastul (cu urme de perete celular) și protoplastul (fără perete celular) sunt fragili, ușor de atacat de fagocite sau sub acțiunea variației presiunii osmotice.

Membrana citoplasmică. Membrana citoplasmică procariotă constă dintr-un strat dublu de fosfolipide și proteine, și se aseamănă foarte mult cu membrana eucariotă. Aceasta este o barieră, ce le permite să interacționeze selectiv cu mediul înconjurător. Membranele sunt asimetrice, constând fiecare din 2 părți, fiecare parte constând din suprafețe și funcții diferite.

Citoplasma. Nucleoidul, plasmidele și cromozomii. Nucleoidul reprezintă regiunea citoplasmei, unde este concentrat ADN-ul cromozomal. Nu este un nucleu propriu-zis, ca la eucariote. Plasmide. Plasmidele pot păstra informația genetică adițională. Ele se află în special în nucleoid. Informația păstrată de acestea nu este vitală, însă poate oferi avantaje selective în anumite circumstanțe. De ex: unele plasmide pot codifica anumite toxine, iar alte plasmide pot păstra informație genetică împotriva antibioticelor.

Cromozomi. Cromozomii bacterieni sunt în formă circulară și păstrează informația genetică a bacteriilor.

Ribozomii și alte structuri multiproteice. Ribozomii sunt structuri prezente în orice celulă. Ribozomii bacterieni sunt similari celulelor eucariote, însă sunt mult mai mici și au o altă structură. Unele antibiotice ar inhiba funcționarea ribozomilor celulelor procariote, astfel cauzând moartea bacteriei.

Caractere morfologice coloniale

Mediul de bază pentru cultivarea bacteriilor – **bulionul de carne lichid sau solidificat cu agar-agar (BCA)**. Prin reproducere pe mediu nutritiv solidificat ia naștere o **colonie** alcătuită din biomasa de celule rezultate prin sciziune din celula unică:

- colonii de tip S (smooth – neted lucios)
- colonii de tip R (rough – rugos, aspru, zbârcit)
- colonii de tip M – la bacterii producătoare de capsule, cu consistență gelatinoasă, mucoidă

Coloniile bacteriene pot prezenta în secțiune un profil lenticular, crateriform, triunghiular și perimetru circular, dantelat sau cu ramificații rizoidale.

Pe BCA coloniile devin vizibile după 24-48 ore și pot avea culori de alb, alb-crem, galben-auriu, oranj-roșu, albastru, fluorescență, caractere microscopice

importante în identificare. Pe medii nutritive lichide bacteriile pot da tulburare și sediment – bacteriile anaerobe sau formează la suprafața lichidelor voal caracteristic, fragil, cutat, gelatinos – bacteriile aerobe.

Bacteriile prezintă forme celulare foarte diversificate, dintre care forme de bază, monocelulare, precum și forme derivate ale acestora ce rezultă în urma asocierii celulelor rezultate prin reproducere.

Dintre formele de bază fac parte următoarele:

- **forma sferică** – denumită coccus, în care sfera este perfectă, de exemplu la micrococi sau ovalară, de exemplu la enterococi, lanceolată la pneumococi și reniformă la gonococi;
- **forma bacilară – cilindrică**, este cel mai frecvent întâlnită, este denumită și bacterium. Formele pot fi drepte cu capete rotunjite – genul *Enterobacter*, cu capete retezate – genul *Bacillus*, fusiforme, măciucate – genul *Corynebacterium*, cu diametruvariabil – genul *Mycobacterium*;
- dintre formele spiralate-elicoidale, specifice bacteriilor patogene, fac parte: **forma vibrio**, **forma spirillum** sub forma unor filamente rigide cu spire largi, **forma spirocheta** sub forma unor filamente flexibile cu mai multe spire;
- **formele filamentoase** sunt caracteristice bacteriilor miceliene cu habitatul în sol și ape (actinomicete, chlamydobacterii etc.).

Caractere fiziologice generale ale bacteriilor

Bacteriile se caracterizează prin complexitate metabolică, cu o mare capacitate de adaptare, răspândire pe cele mai diverse medii, ca urmare a producerii de enzime care le permite utilizarea în nutriție a compușilor organici macromoleculari (protide, poliglucide, lipide).

În raport cu temperatura, bacteriile se dezvoltă într-un domeniu larg, între 10°C și 90°C; majoritatea bacteriilor agenți de alterare a alimentelor sunt bacterii mezofile și dau alterări la temperatura camerei (bacterii de putrefacție). Bacteriile în formă vegetativă sunt inactivate pe cale termică la temperaturi de pasteurizare, iar sub formă de endospori, la temperaturi de sterilizare.

În raport cu oxigenul majoritatea bacteriilor sunt aerobe (ex. bacterii acetice), care cresc în semiaerobioză (ex. bacterii lactice), dar un grup restrâns de bacterii sunt adaptate să crească în strictă anaerobioză (ex. genul *Clostridium*).

Bacteriile se pot dezvolta în domeniul de pH1-11 cu zone optime la valori acide pentru bacterii acidotolerante (bacterii acetice, lactice) sau la valori neutre pentru bacterii de putrefacție.

Clasificarea generală a bacteriilor

Pentru identificarea unei specii sunt uneori necesare 40 până la 100 de teste. Criteriul de bază – afinitatea tinctorială; familia ca unitate taxonomică conține același tip de bacterii: Gram pozitive sau Gram negative. Criterii fiziologice: teste de asimilare sau fermentare a glucidelor, relația față de oxigen, temperatură, pH, rezistență la inhibitori ș.a.

Clasificarea de bază – Bergey (1952) – bacteriile sunt grupate în 10 ordine și 47 familii – clasificare reluată în 1984 după criterii morfologice – în 33 secțiuni.

Regnul **PROCARIOTAE** – două diviziuni:

- **SCOTOBACTERIA** – bacterii care folosesc pentru creștere și multiplicare energia rezultată din reacții chimice:
 - o **clasa BACTERIA**

- clasa **ACTINOMYCES**
- clasa **MOLICUTES**

- **PHOTOBACTERIA** – bacterii ce conțin pigmenți celulari similari clorofilei și care pot folosi energia luminoasă în procese de biosinteză celulară

Clasa **BACTERIA**

Ordinul PSEUDOMONADALES – bacterii Gram negative cu habitat în sol și ape, aerobe, nesporulate.

Familia **Pseudomonadaceae** – genuri:

- **Pseudomonas** – bastonașe tipice, răspândite pe produse vegetale, carne, pui; dau alterarea produselor refrigerate
- **Acetobacter** – bacterii acetice, produc oxidarea alcoolului etilic – la fabricarea acidului acetic de fermentație
- **Xanthomonas** – dau alterări ale legumelor, produc un polimer – xanthanul
- **Zymomonas** – bacterii care pot produce fermentarea glucidelor cu formarea de alcool; sunt folosite la obținerea alcoolului carburant din materii celulozice.

Familia **Nitrobacteriaceae**, cu genurile **Nitrobacter** și **Nitrosomonas** care produc oxidarea compușilor cu azot rezultați din putrefacție, cu transformarea azotului amoniacal în azotiți și azotați, formă asimilabilă de către plante.

Familia **Thiobacteriaceae** – produc oxidarea compușilor cu sulf. Bacterii din genul **Thiobacillus** – agenți ai coroziunii biologice.

Familia **Spirillaceae** – produc degradarea celulozei în condiții aerobe. Bacterii ale genului **Cellulomonas** – prelucrarea deșeurilor de hârtie pentru obținerea de proteină bacteriană folosită în scop furajer.

Ordinul EUBACTERIALES – bacterii propriu-zise, foarte răspândite ce cuprind bacterii în formă de coccus, bacterium și forme derivate prin sciziune

Familia **Achromobacteriaceae** – bacterii nesporulate Gram negative, produc putrefacția:

- **g. Achromobacter** – produc prin degradarea proteinelor amine biogene toxice, sunt bacterii aerobe, produc alterarea produselor refrigerate
- **g. Alcaligenes** – sunt întâlnite în lapte, carne, pui, pește și materii fecale
- **g. Flavobacterium** – se prezintă sub formă de bastonașe, produc un pigment galben-roșu și alterarea produselor la refrigerare.

Familia **Azotobacteriaceae** – bacterii care folosesc azotul atmosferic în nutriție, au rol în circuitul natural al azotului și pentru obținerea de îngrășăminte biologice – **Azotobacter chroococcum**

Familia **Bacillaceae** – bacterii sub formă de bastonașe, Gram pozitive, producătoare de endospori:

- **g. Bacillus** – 25 specii – bacterii de putrefacție aerobe, anaerobe; unele specii selecționate se folosesc pentru obținerea de enzime: amilaze, proteaze, glucanaze
- **g. Clostridium** – 93 specii – bacterii de putrefacție anaerobe, producătoare de toxine, bacterii butirice, bacterii producătoare de solvenți
- familia **Enterobacteriaceae** – bacterii Gram negative, nesporulate, aerobe/facultativ anaerobe, patogene/facultativ, cu habitatul în tractul digestiv
- **g. Escherichia** – bacterii de putrefacție, facultativ patogene (agenți ai gastroenteritelor) se pot înmulți în produse alimentare, pot produce toxine

E.coli – indicator sanitar pentru verificarea condițiilor de igienă la fabricarea produselor alimentare

- **g. Enterobacter** – face parte din microflora intestinală
- **g. Proteus** – bacterii de putrefacție, mobile, aerobe, produc alterarea cărnii, a ouălor păstrate la temperatura camerei
- **g. Shigella** – bacterii enteropatogene (agentul dizenteriei)
- **familia Lactobacillaceae** – bacterii lactice Gram pozitive, nesporulate, facultativ anaerobe, sub formă de bacili (bastonașe subțiri sau sub forme derivate de la coccus).
- **g. Streptococcus** – cuprinde bacterii sub formă de streptococi. O parte din speciile genului au trecut în **g. Lactococcus**, folosite drept culturi starter în industria laptelui
- **g. Lactobacillus** – bacterii lactice acidotolerante, folosite în industria laptelui și pentru conservarea prin murare a produselor vegetale
- **g. Pediococcus** – bacterii lactice sub formă de tetrade. Pot produce acirea berii
- **g. Leuconostoc** – bacterii lactice heterofermentative, agenți de alterare a sucurilor, siropurilor de zahăr ș.a. Pot produce biosinteza dextranului

Familia **Micrococcaceae** – bacterii Gram pozitive cu forma coccus sau forme derivate prin sciziune

- **g. Micrococcus** – bacterii aerobe/anaerobe, de putrefacție
- **g. Sarcina** – bacterii aerobe de putrefacție
- **g. Staphylococcus** – bacterii facultativ patogene; produc enterotoxine și sunt agenți ai intoxicațiilor alimentare

Familia **Propionibacteriaceae** – bacterii nesporulate Gram pozitive, produc fermentația propionică.

- **g. Propionibacterium** – bacterii folosite la fabricarea brânzeturilor cu pastă tare și desen pentru obținerea vitaminei B12.

CLASA ACTINOMYCETES

Ordinul ACTINOMYCETALES – bacterii filamentoase, Gram pozitive, saprofite sau facultativ patogene, folosite industrial pentru obținerea de substanțe biologice active

Familia **Mycobacteriaceae** – bacterii patogene – **Mycobacterium tuberculosis** (agentul tuberculozei) și **Mycobacterium leprae**

Familia **Actinomycetaceae** – bacterii patogene pentru animale și plante. Au rol în formarea humusului și la închiderea la culoarea solului.

Familia **Streptomycetaceae** – bacterii filamentoase:

- **g. Streptomyces** – numeroase specii sunt folosite pentru obținerea de antibiotice (tetraciline, streptomycină, cloramfenicol etc.) sau pentru enzime (glucozizomeraze).

Ordinul RICKETSIALES – cuprinde bacterii obligat parazite ale insectelor, transmisibile prin înțepături la animale și om.

- **g. Rickettsia** – cu sp. **R. prowazeki** – agent al tifosului eczantematic
- **g. Coxiella** – bacterii patogene, produc febra Q hemoragică. **C. bruneti** se poate transmite prin lapte

3. NUTRIȚIA MICROORGANISMELOR

Nutriția este un proces fiziologic complex prin care microorganismele își procură elementele necesare și energia pentru biosinteza compușilor celulari, pentru creștere, reproducere și întreținerea funcțiilor vitale.

Procesul de nutriție se desfășoară în cadrul metabolismului celular prin reacții de degradare a compușilor macromoleculari în compuși cu masă moleculară redusă ce pot fi transportați în interiorul celulei, reacții exergonice ce au loc în cadrul catabolismului celular. Concomitent cu reacțiile de catabolism, folosind compuși simpli și energie, celula vie sintetizează compuși celulari esențiali pentru creștere, în cadrul anabolismului. Viața celulei microbiene este posibilă atât timp cât cele două procese se desfășoară concomitent.

Celula bacteriană poate utiliza între 300-600 tipuri de molecule diferite din care aproximativ 50% sunt reprezentate de molecula de apă și ioni. Se apreciază că fără a lua în calcul moleculele de apă celula de drojdie poate utiliza până la 500 molecule mici și peste 4000 de macromolecule.

Microorganismele întâlnite în industria alimentară sunt microorganisme chimiosintetizante și își obțin energia prin degradarea compușilor organici cu eliberarea energiei potențiale a substratului nutritiv pe care aceasta se dezvoltă dând de cele mai multe ori alterarea specifică a acestuia. Prin substrat nutritiv se înțelege acel mediu care conține apă, surse de energie (de natură glucidică), surse asimilabile de azot, săruri minerale și facultativ factori de creștere.

3.1. TIPURI NUTRIȚIONALE ȘI SURSE NUTRITIVE

Microorganismele care pot folosi CO₂ ca sursă unică sau principală de carbon sunt numite autotrofe spre deosebire de cele heterotrofe care folosesc ca sursă de carbon moleculele organice preformate de la alte organisme.

Ca rezultat al adaptării microorganismelor la diferite condiții de mediu ambiant, în funcție de sursele accesibile, acestea pot aparține la 4 tipuri nutriționale:

- **chemoorganotrofe heterotrofe** își obțin energia pe cale chimică, prin procese de oxidare a compușilor organici și procură oxigenul și hidrogenul din compuși organici și anorganici (fungi și bacterii);
- **fotolitotrofe autotrofe** (alge, bacterii din ape) folosesc energia luminoasă în procese de biosinteză și folosesc sursa de carbon, hidrogen și oxigen din compuși anorganici;
- **fotolitotrofe heterotrofe** folosesc energia luminoasă iar ca sursă majoră de carbon, CO₂ din aer (bacterii sulfuroase);
- **chimiolitotrofe autotrofe** (sulfobacterii, ferobacterii) își obțin energia pe cale chimică, iar ca sursă de carbon și hidrogen servesc compușii anorganici.

Microorganismele cu rol în industria alimentară (drojdii, mucegaiuri, și bacterii aparțin primului tip nutrițional. Fiind adaptate să se dezvolte prin asimilarea carbonului din materie organică sunt cunoscute ca agenți selecționați pentru dirijarea proceselor fermentative industriale, ca agenți de alterare sau patogeni.

În primul tip nutrițional al microorganismelor organotrofe se disting următoarele subgrupe:

- **microorganisme saproorganotrofe (saprofite)** se dezvoltă folosind ca sursă de carbon și energie, materia organică nevie. În această categorie intră

majoritatea microorganismelor cu aplicații industriale, dar și bacteriile de putrefacție, microorganismele care se dezvoltă pe alimente;

- **microorganisme comensale** se dezvoltă la suprafața sau interiorul organismelor vii (plante sau animale) beneficiind de această asociere și hrănindu-se cu substanțe ce rezultă în mod natural din activitatea metabolică a acestora. Se pot exemplifica microorganisme din microbiota epifită a plantelor, a pielii, din microbiota intestinală;
- **microorganismele patogene** sau **parazite** pot fi strict patogene fiind specializate să se hrănească și să trăiască parazitând celula vie;
- **microorganismele potențial patogene** pot să crească pe produse alimentare bogate în nutrienți și pot în anumite condiții să elaboreze toxine, însă prin îngerarea alimentului contaminat se produc stări de toxiinfecții alimentare sau toxicoze.

Surse de nutriție preferate de microorganismele organotrofe

Surse de carbon

Nu există nici o sursă de carbon care să nu fie utilizată pe cale microbiană. Există microorganisme care pot utiliza foarte mult sursa de carbon, exemplu *Pseudomonas cepacia* care pot utiliza peste 100 surse diferite de carbon, alte bacterii, de exemplu din genul *Letospira* folosesc ca sursă principală de C și energie numai acizii grași cu număr mare de C în moleculă.

Dintre sursele de C naturale întâlnite în materii prime alimentare sau utilizate în compoziția mediilor de cultură sunt preferate următoarele:

- **poliglucide**: amidon, celuloză, substanțe pectice, care pot fi folosite în special de către bacterii și microorganisme producătoare de enzime specifice extracelulare;
- **monoglucide (hexoze, pentoze), diglucide**, reprezintă atât sursa de carbon cât și de energie pentru toate microorganismele și sursa de bază în nutriția drojdiilor;
- **acizi organici (acid lactic, malic, acetic)** pot fi o sursă de C pentru microorganisme și unele drojdii;
- **alcoolii** sunt utilizați de către drojdii oxidative (g. *Candida*, g. *Pichia*) și de bacterii (g. *Acetobacter*).

Deoarece carbonul reprezintă max. 50% din substanța uscată a celulei la alcătuirea mediilor de cultură se calculează cantitatea de nutrient ce trebuie adăugată (în funcție de masa moleculară și de conținutul în carbon) pentru obținerea unei cantități corespunzătoare de biomasă.

Nutrienți cu N,P,S

Pentru creștere, microorganismele necesită cantități mari de azot, fosfor și sulf, iar organotrofele le pot procura fie din sursele organice cu carbon, fie din compușii anorganici.

Se știe că azotul (10-14% din substanța uscată a celulei) este necesar pentru sinteza de aminoacizi, purine, puridine, unele lipide, coenzime.

Multe microorganisme pot folosi azotul din aminoacizi și amoniac prin încorporarea directă, cu ajutorul unor enzime. Unele bacterii pot reduce și asimila azotul atmosferic folosind un sistem de nitrogenaze și au un rol vital în asigurarea circuitului natural al azotului.

Proteinele pot fi folosite în nutriție numai de către microorganismele ce produc proteaze extracelulare, respectiv bacterii - agenți cu putrefacție și mucegaiuri - agenți de putrezire. Se mai pot folosi în mediile de cultură a drojdiilor - sulfatul de amoniu și

ureea. Alți compuși cum ar fi nitrații sunt asimilați de către mușcăiuri și bacterii, nitriții numai de către bacterii (g. *Nitrosomonas*) și cu efect toxic pentru drojdii (înmulțirea este oprită la concentrații de 200 mg nitrați /dm³).

Nutriția minerală

Pentru procurarea elementelor minore, sunt preferate de către microorganisme sărurile acestora în următoarea succesiune: fosfați, sulfăți, azotați, carbonați. Efectul pe care îl are adăugarea diferitelor substanțe minerale asupra creșterii poate fi diferit prin indicii de utilitate specific, ce reprezintă raportul dintre biomasa formată pe un mediu de cultură complet și cea rezultată în mediul carentat în substanța /elementul respectiv.

Factorii de creștere

Factorii de creștere sunt substanțele organice ce sunt esențiale pentru creșterea microbiană și nu pot fi sintetizate de microorganismul respectiv.

Conform exigențelor nutritive ale microorganismelor, încadrate în primul tip de nutriție se poate stabili o anumită succesiune; cele mai pretențioase din punct de vedere nutritiv sunt bacteriile gram pozitive, urmate de bacterii Gram-negative, și respectiv drojdii și mușcăiuri.

Factorii de creștere ca structură și funcție metabolică intră în următoarele 3 categorii:

- aminoacizii sunt necesari pentru sinteza de proteine / enzime;
- purine și pirimidine, pentru sinteza acizilor nucleici;
- vitamine, care funcționează ca grupuri prostetice ale unor enzime sau cu funcție de coenzime.

În funcție de natura microorganismelor necesarul de aminoacizi variază între 0 și 18 aminoacizi.

Dintre microorganismele din industria alimentară, drojdiile din genul *Saccharomyces* necesită biotină și acid paraaminobenzoic, bacteriile lactice ale genului *Lactobacillus* necesită acid folic, acid nicotinic, biotină, vitamina B, piridoxina, bacteriile acetice necesită acid p-aminobenzoic, iar *Enterococcus faecales* are nevoie de 8 vitamine diferite pentru creștere.

Există și un grup restrâns de substanțe denumite factori stimulatori de creștere care fără să fie indispensabile, prezența lor accelerează ritmul de creștere celulară.

Cunoașterea condițiilor de cultură și a exigențelor de nutriție a fiecărui microorganism are o importanță deosebită atât în practica de laborator cât și la cultivarea industrială, deoarece permite reglarea activității fiziologice fie în direcția obținerii de biomasă, fie a unor produse de metabolism cu importanță economică.

3.2. MODALITĂȚI DE TRANSPORT A NUTRIENȚILOR ÎN CELULA MICROBIANĂ

Pentru realizarea procesului de nutriție este obligatoriu ca nutrienții să pătrundă în interiorul celulei pentru a fi metabolizați.

Nutrienții solubili cu molecule mici pot pătrunde în celula microbiană pe diferite căi. Una din căile cele mai frecvente este pătrunderea prin difuzie și anume prin:

- **difuzie pasivă** este difuzia ce se realizează ca urmare a unui gradient de concentrație, posibil când în exteriorul celulei concentrația nutrientului este superioară celei din interiorul celulei. Prin anumiți pori ai membranei plasmatică nutrientul pătrunde în interior și este metabolizat.

- **difuzie facilitată** se realizează ca urmare a prezenței în biomembrane a unor proteine receptoare denumite permeaze, localizate la nivelul plasmalemei sau în spațiul periplasmic. Permeaza recunoaște și leagă molecula solubilă a apei schimbându-și conformația și o eliberează în interiorul celulei. Apoi aceasta își revine poziția orientată spre exteriorul membranei plasmatică și este pregătită pentru a prelua o nouă moleculă. Acest proces poate avea loc atâta timp cât concentrația moleculelor nutrient este mai mare în exteriorul celulei față de cea internă.

Difuzia facilitată este mai importantă la celulele de tip eucariot pentru transportul aminoacizilor și al glucidelor, în timp ce la procariote servește pentru transportul glicerolului.

Microorganismele adesea se întâlnesc în habitate în care conținutul în nutrienți este foarte redus încât pentru creștere este important transportul și concentrarea lor în celulă. În această situație, transportul se face contra gradientului normal de concentrație, cu consum de energie, prin transport activ și translocare de grup.

Transportul activ – transportul în celulă este asigurat chiar în absența gradientului de concentrație și se realizează cu consum de energie. Transportul se activează ca urmare a energiei eliberate prin transformare ATP în ADP.

Translocarea de grup – este un transport activ întâlnit la drojdii și mușcăiuri în care intervine un sistem enzimatic complex de transferaze, care permit pătrunderea glucidelor prin membrane sub forma esterilor fosforici. Celulele pot face schimb cu mediul exterior nu numai cu ioni și glucide ci și cu glucide compuși macromoleculari.

Astfel, bacteriile de exemplu pot secreta proteine printr-un proces de exocitoză. Este posibilă și pătrunderea unor astfel de macromolecule în interiorul celulei prin procese de endocitoză.

3.3. MEDII DE CULTURĂ

Un mediu de cultură reprezintă un substrat nutritiv complex, cu rol de aliment, care trebuie să asigure microorganismului ce urmează a fi cultivat, cantitatea necesară de apă, surse de carbon, azot, substanțe minerale, factori de creștere, substanțe care să îi furnizeze cantitatea de energie cât și toate elementele folosite de celulă în procese de creștere, reproducere și întreținerea funcțiilor vitale.

Mediul de cultură trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să corespundă din punct de vedere nutritiv;
- să aibă o concentrație a substanței dizolvate în mediu care să nu influențeze negativ schimburile osmotice ale celulei;
- să nu conțină substanțe toxice sau să genereze compuși toxici în urma creșterii culturii microbiene;
- să aibă un anumit pH sau rH;
- să fie steril astfel încât să nu dezvolte numai celule introduse prin inocul.

În practica de laborator mediile de cultură se folosesc pentru izolarea din medii naturale a diferitelor microorganisme pentru obținerea de culturi pure, pentru cultivarea acestora în scopul obținerii de biomasă sau pentru întreținerea culturilor pure selecționate.

În scop industrial mediile de cultură se folosesc pentru obținerea de celule sau a compușilor rezultați prin activitatea microorganismelor selecționate.

În funcție de destinația lor, mediile de cultură se diferențiază astfel:

a. medii de cultură generale care asigură dezvoltarea unui număr mare de specii și genuri deoarece includ în compoziția lor substanțe nutritive diversificate.

Dintre mediile de cultură generale folosite în practica laboratorului de microbiologie menționăm:

- bulionul de carne lichid sau gelozat (BCA);
- mediul triptonă - extract de drojdii - glucoză – agar;
- mustul de malț – agar (MMA) pentru cultivarea drojdiilor și mucegaiurilor;

b. medii de cultură selective sunt medii cu o compoziție chimică definită care permit dezvoltarea unui grup restrâns de microorganisme sau chiar a unei specii. Aceste medii conțin pe lângă substanțe nutritive și substanțe cu efect inhibitor asupra altor microorganisme însoțitoare întâlnite în microbiota din care se face izolarea culturii ce dorim să o selecționăm. Un mediu selectiv folosit la determinarea bacteriilor coliforme este BLBV (bulion – bilă – lactoză – verde briliant) în care sărurile biliare inhibă alte bacterii, în timp ce coliformii sunt adaptați. Numărul mediilor selective este foarte mare și permit izolarea unor specii de interes industrial sau se folosesc pentru identificarea, determinarea microorganismelor contaminante în produse alimentare.

c. medii de cultură de diferențiere – aceste medii permit separarea speciilor în funcție de anumite caractere biochimice, atunci când acestea au fost selectate dintr-o microbiotă eterogenă.

d. medii de îmbogățire (fortificate) sunt destinate separării și cultivării unor microorganisme pretențioase din punct de vedere nutritiv și care se află în număr redus în produsul analizat din punct de vedere microbiologic.

În funcție de compoziție și proveniență, mediile de cultură pot fi medii naturale și medii sintetice.

a)mediile naturale sunt cele mai utilizate deoarece reproduc condițiile în care se dezvoltă microorganismele. Mediile naturale de origine vegetală sunt sucuri de fructe, de legume, mustul de malț, legume fierte/ terciute, fructe, infuzii de plante.

Ca medii de origine animală se folosesc după sterilizare, laptele, sânge (pentru bacterii facultativ patogene), zerul, carnea, bulionul de carne, ficat, ouă.

În condiții de laborator se folosesc atât medii lichide, în special pentru cultivarea microorganismelor facultativ anaerobe, pentru studiul proceselor fermentative, medii solide – pâine, cartofi felii, ș.a. și frecvent medii solidificate obținute prin adăugarea în mediile lichide a unor agenți de solidificare.

Pentru solidificarea mediilor de cultură se folosește:

- **agar – agarul (geloza)** un diglucid obținut din alge ale genului *Gelidium* având în structură molecule de galactoză și acid D – galacturonic legate prin legături 1,2,1,3 glicozidice. În stare purificată se prezintă sub formă de pulbere sau fibre și se adaugă în cantitate de 0,5 – 2 % mediu lichid.
- **gelatina** agent de solidificare de natura proteică, extrasă din țesuturi organice. Se folosește în cantitate de 12 – 15 g% .

În afara mediilor descrise și care se pot prepara în condiții de laborator, numeroase firme sunt specializate în fabricarea de medii de cultură ce pot fi livrate sub diverse forme. Astfel sunt medii gata preparate sau sub formă de pulberi ce pot fi reconstituite conform rețetei și au un termen mare de valabilitate.

Medii fermentative sunt medii de cultură industriale destinate producerii unor cantități mari de celule sau pentru obținerea de produși de metabolism cu valoare economică.

Diversitatea mediilor de cultură este datorată și capacitații de adaptare a numeroase microorganisme întâlnite în habitaturile naturale cât și de faptul că prin modificarea compoziției mediilor de cultură se pot obține randamente superioare în produși de metabolism microbial cu valoare economică.

Mediile de cultură sunt utilizate frecvent în tehnici microbiologice de laborator, pentru izolarea, cultivarea și întreținerea culturilor pure și pentru controlul microbiologic al produselor alimentare.

4. METODE DE IZOLARE ȘI OBȚINERE A CULTURILOR PURE

Cultura pură reprezintă o biomasă de celule rezultate prin reproducere dintr-o singură celulă aflată într-un mediu nutritiv steril, cu volum limitat. Cultura pură este considerată și colonia care se formează ca rezultat al izolării unei celule sau a unei unități formatoare de colonii, atunci când aceasta este localizată pe un mediu nutritiv solid. Puritya unei culturi se poate obține și prin repicare, deci prin transfer de celule din eprubeta ce conține cultura pură, în alt vas cu mediu de cultură steril.

În practica de laborator se cunosc numeroase metode prin care se poate realiza separarea unei singure celule din microbiota eterogenă a mediilor naturale.

Metodele cunoscute și practicate în laborator în scopul izolării culturilor pure pot fi clasificate în metode fizico-mecanice și metode biologice.

4.1. METODE FIZICE DE IZOLARE ȘI OBȚINERE A CULTURILOR PURE

Metode prin răspândire – se folosesc pe scară largă, fiind ușor de executat, având ca principiu răspândirea celulelor din medii naturale unde acestea se află în număr mare, prin diluare în medii lichide sau prin diseminare mecanică pe suprafața mediilor sterile.

Metode scarificate. În placa Petri se repartizează un mediu de cultură adecvat, de exemplu MMA/BCA și după solidificarea mediului, cu firul metalic se recoltează celule din mediul natural și se execută trasări pe suprafața mediului, astfel încât diversele celule rămân distanțate între ele. Prin termostatare 48-72 ore, din colonia care corespunde microorganismului ce trebuie izolat, se face repicare într-o eprubetă cu mediu solid înclinat și astfel se obține o cultură pură.

Metoda în strii este similară, în schimb drept suprafață de răspândire se folosește mediul înclinat din 2-3 eprubete, prin transferul de celule din mediul natural, prin realizarea de striuri, în mod succesiv. Aceste metode se folosesc și în cazul în care o cultură pură este contaminată cu microorganisme străine în perioada de păstrare a culturii și aceasta trebuie să fie salvată.

Metoda culturală Koch este folosită în special pentru izolarea de drojdii. Ca mediu de răspândire se folosește MMA repartizat în 3 eprubete, fluidificat și menținut la 40°C. Din mediul natural, de exemplu un must în fermentație, se recoltează o ansă care se introduce succesiv în cele 3 eprubete, cu agitare, care să asigure desprinderea celulelor. După inoculare și uniformizare, conținutul fiecărei eprubete se repartizează în câte o placă Petri prin solidificare celulele rămân fixate în gel și prin multiplicare vor forma colonii izolate. În funcție de densitatea celulelor recoltate inițial în placa a 2-a sau a 3-a coloniile sunt suficient de distanțate (se preferă o distanță de circa 2 cm), pentru a putea face izolarea din colonia adecvată a culturii pure, prin repicare în eprubetă cu MMA.

Metode prin diluare. În prima etapă, din mediul natural se execută diluții decimale în ser fiziologic steril, astfel încât numărul de celule într-o micropicătură din ultima diluție să fie redus.

Metoda Lindner se folosește pentru izolarea de drojdii fermentative. Din diluția convenabilă, cu ajutorul unei penițe topografice se plasează aprox. 9 picături pe suprafața unei lamele sterile. Lamela se amplasează cu picăturile în jos pe o lamă cu excavație și se studiază la microscop fiecare picătură. Se notează cu un marker conturul picăturii în care se află o singură celulă. Se desprinde lamela și cu ajutorul unei benzi sterile de hârtie se absoarbe picătura notată. Odată cu lichidul se absoarbe și celula de izolat, apoi banda se introduce într-o eprubetă cu mult lichid. Celula va da prin reproducere o cultură pură. Deși este meticuloasă, metoda propusă de Lindner este o metodă precisă, deoarece se face sub control microscopic.

Metoda Naumov este folosită pentru izolarea culturilor pure de mucegaiuri. Dintr-o diluție convenabilă se aplică distanțat micropicături peste care se adaugă picături de mediu MMA fluidificat (42°C) și după 3-8 zile se selectează din picătura cu o singură colonie cultura pură dorită.

O metodă simplificată pentru separarea sporilor fungici constă în inundarea unei plăci cu MMA cu 1-2 cm³ din diluția convenabilă. Sporii care au rămas atașați de mediu vor da colonii izolate. În general mucegaiurile nu ridică probleme la izolare deoarece cresc sub formă de colonii mari pe diverse alimente și pentru obținerea în cultură pură se face repicarea de spori situați în centrul coloniei.

Metode de izolare cu ajutorul micromanipulatorului. Este o metodă precisă și se realizează cu ajutorul unui aparat prevăzut cu tuburi capilare cu care se poate face selecția celulelor dorite din preparate studiate la microscop. Cu ajutorul micromanipulatorului se poate face recoltarea de ascospori din celule ascogene și este folosit în dirijarea proceselor de fuziunea protoplaștilor, pentru conjugare etc.

4.2. METODE BIOLOGICE DE OBȚINERE A CULTURILOR PURE

Metodele biologice sunt foarte diverse și se bazează pe proprietăți fiziologice ale microorganismelor de izolat care să se diferențieze clar de cele ale microorganismelor însoțitoare din același biotop. Uneori prin aceste metode se face izolarea unui grup cu caractere taxonomice apropiate și apoi se face izolarea de culturi pure prin tehnici de răspândire sau prin folosirea mediilor selective.

O metodă biologică clasică este **metoda Burri** prin care se face separarea microorganismelor în funcție de necesarul de oxigen pentru creștere. Dintr-un mediu natural se face inocularea în BCA termostatat la 42°C și după uniformizare acesta se introduce într-un tub de sticlă prevăzut la un capăt cu dop de cauciuc. Prin răcire celulele sunt immobilizate în gel și prin termostatare în funcție de accesul oxigenului din aer, în zona tubului prevăzut cu dop de cauciuc se vor dezvolta bacterii anaerobe, intermediar bacterii microaerofile, iar în stratul de mediu la care aerul a pătruns prin dopul de vată al tubului, bacterii aerobe.

Prin metode biologice pot fi selectate bacteriile sporogene din medii naturale pe baza termorezistenței deosebite a endosporilor. De exemplu, *Bacillus subtilis* se poate izola din infuzie de fân, deoarece endosporii rezistă la fierbere, în timp ce alte bacterii sunt distruse și prin germinare trec în forme vegetative și care prin înmulțire prin sciziune rămân asociate formând în 24 ore un voal cutat.

Numeroase metode de izolare se bazează pe introducerea în medii de cultură a unor substanțe chimice cu efect inhibitor asupra microorganismelor de care trebuie separată cultura dorită. De exemplu, prin introducerea de 0,02% actidionă are loc

inhibarea dezvoltării drojdiilor aflate în amestec cu bacterii. Metoda este folosită pentru izolarea unor bacterii ce pot produce contaminarea drojdiilor folosite sub formă de culturi pure în industriile fermentative.

5. IMPORTANȚA PRACTICĂ A CULTURILOR PURE

Izolarea și obținerea culturilor pure, cunoașterea cineticii de creștere prezintă o importanță practică deosebită în următoarele domenii:

1. Identificarea, selecționarea și îmbunătățirea proprietăților de biosinteză

Culturile pure sunt folosite pentru studiul proprietăților morfologie și fiziologice, în scopul identificării, caracterizării și stabilirii domeniului de utilizare a culturii. Sub formă de culturi pure microorganismele pot fi supuse unor tratamente fizico-chimice prin care se pot induce modificări genetice la nivelul acizilor nucleici, cu obținerea de culturi mutante, din rândul cărora se face din nou selecția tulpinilor performante.

2. Obținerea culturilor starter în procese fermentative industriale

Pornind de la cultura pură, în biotehnologii alimentare prin cultivarea în medii adecvate se obține cantitatea necesară de inocul/maia folosită drept cultură starter a procesului fermentativ.

Inoculul reprezintă un mediu nutritiv steril în care s-au înmulțit celule aparținând unei culturi pure, aflată în etapa finală a creșterii exponențiale. Cantitatea de inocul trebuie astfel calculată încât prin introducerea sa în mediul fermentativ steril, concentrația în celule să asigure declanșarea rapidă a procesului. În funcție de specificul biotehnologic este obligatorie asigurarea continuității în transfer pentru aprovizionarea cu inocul activ, la perioada solicitată de producție.

Utilizarea culturilor pure în biotehnologii alimentare (la fabricarea berii, alcoolului, vinului, produse lactate acide, panificație etc.) permite obținerea unor produse cu calitate constantă.

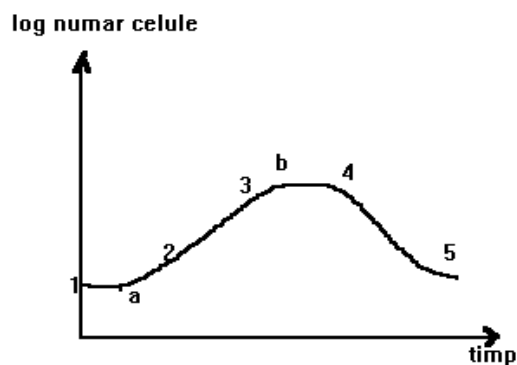
6. CURBA DE CREȘTERE A CULTURII MICROBIENE

Prin inocularea de celule, aparținând unei culturi pure, într-un mediu nutritiv steril se poate stabili dinamica de creștere prin studiul vitezei de acumulare a biomasei sau prin creșterea numărului de celule raportat la unitatea de volum a mediului.

În condițiile experimentale, dinamica multiplicării microorganismelor este bine cunoscută. Procesul evoluează într-o serie de faze succesive.

Fig.3. Curba de multiplicare a microorganismelor

1÷2-faza de repaos (faza lag);
1÷a-perioada de adaptare;
a÷2-perioada de refacere;
2÷3-faza exponențială; 3÷4-faza staționară;
3÷b- perioada de spor de creștere negativ;
b÷4-perioada de staționare propriu-zisă;
5-faza finală de declin.



1) Faza de latență, de creștere zero sau de lag reprezintă etapa de timp când după inoculare numărul celulelor rămâne neschimbat, sau chiar scade, noile condiții de mediu implică latența inducției acelor enzime necesare pentru adaptarea la mediul nutritiv. Faza de latență apare deci ca o perioadă de adaptare la condițiile noi de cultură, în care microorganismele viabile din inocul își acumulează în celulă metaboliți și sistemele necesare creșterii, în cazul în care aceste componente biochimice le lipseau datorită condițiilor de mediu anterioare inoculării. În cazul drojdiilor această fază poate dura 1-2 ore, durată ce depinde de compoziția mediului și capacitatea de reglare a metabolismului propriu. Faza lag se poate prelungi mult dacă inoculul este obținut din culturi vechi sau care s-au păstrat în condiții de refrigerare. În schimb dacă la inoculare s-a folosit o cultură viguroasă, aflată în faza activă de creștere, în mediul cu o compoziție similară, faza lag este scurtă sau poate să fie absentă.

2) Faza de multiplicare exponențială sau de creștere logaritmică este caracterizată prin aceea că, după o scurtă perioadă (cca. 2 ore) de accelerare a ritmului de creștere, în care multiplicarea se produce cu o viteză progresivă mărită, acest ritm devine constant și caracteristic în anumite condiții de cultură, durata unei generații fiind minimă. Perioada de echilibru poate fi menținută numai atât cât nu intervin alterări importante, pe care creșterea le poate provoca în compoziția mediului. De exemplu, numărul de celule de drojdie sau de bacterii și cantitatea de materie vie formată crește temporar după o progresie geometrică cu rația 2. Celulele aflate în faza exponențială de multiplicare sunt cele mai potrivite pentru cercetări de genetică și fiziologie.

3) Faza staționară (de maturare) în care numărul celulelor viabile este maxim și rămâne constant o perioadă de timp. De exemplu, celulele de drojdie nu mai înmuguresc, își măresc volumul și tind spre forma sferică, se rotunjesc. Celulele de microorganisme au în această fază caracteristicile morfologice cele mai tipice genului și speciei. Această fază poate fi prelungită atunci când urmărim păstrarea culturii pure, prin modificarea unor factori care scad viteza de metabolism celular.

4) Faza de declin se caracterizează printr-o scădere în progresie geometrică în raport cu timpul a numărului de celule vii. Pe măsură ce mediul devine mai puțin favorabil, celulele vii nu se mai multiplică, deși activitatea lor mai continuă un timp după care mor și intră în autoliză. La sfârșitul acestei ultime faze se înregistrează maximum absolut al numărului total de celule formate pe parcursul întregii evoluții a culturii.

7. PROCEDEE DE CONSERVARE A CULTURILOR PURE

Sub formă de culturi pure sunt păstrate microorganismele aflate în studiu și care prezintă proprietăți de biosinteză remarcabile, culturi întreținute și înregistrate în colecții autorizate de microorganisme, denumite micoteci.

Dintre tehnicile aplicate pentru conservarea culturilor pure, tehnici bazate pe prelungirea fazei staționare de creștere și evitarea etapei de declin, se cunosc următoarele:

- **repicarea periodică** – prin transfer de celule din eprubeta cu cultura pură în care mediul nutritiv este epuizat, în eprubeta cu mediu nutritiv steril cu compoziție

similară. Intervalul de repicare este dependent de natura culturii, compoziția mediului și temperatura de păstrare. În timp ce bacteriile lactice necesită repicări la intervale de 1-3 săptămâni, drojdiile se pot păstra pe MMA 3-6 luni, iar bacteriile sporulate 6-12 luni. Mucegaiurile sunt rezistente la păstrare și chiar după uscarea mediului, spori se mențin viabili ani de zile. Procedul de repicare periodică necesită un mare volum de muncă, prezintă risc de contaminare și este greu de realizat atunci când numărul de culturi de întreținut este mare;

- **prelungirea intervalului între două repicări** – prin scăderea vitezei de metabolism a celulelor și deci evitarea stării de declin ce poate duce la pierderea culturii se poate realiza prin:

- *Menținerea culturilor la temperaturi scăzute*, în condiții de refrigerare sau congelare. Culturile de fungi păstrate la 5°C se transferă anual, iar dacă păstrarea se face la 16°C la interval de 6 luni.
- *Privarea de oxigen*. În absența oxigenului din aer, microorganismele aerobe trec în stare latentă de viață. Pentru drojdii și mucegaiuri, cultura dezvoltată în mediu solidificat (drept) se acoperă cu un strat de ulei de parafină steril. Când celulele vii se acoperă cu ulei de parafină (sterilizat în prealabil la 170°C, 2 ore) procesele metabolice ale fungilor decurg de 10 ori mai lent.
- *Reducerea umidității mediului* conduce la trecerea celulelor în stare de anabioză care poate fi menținută timp îndelungat fără a se produce modificări intracelulare, ireversibile. Bacteriile sporogene ale genului *Bacillus* se pot menține sub formă de endospori prin antrenarea culturii în eprubete cu nisip steril și după evaporarea apei spori se mențin viabili, adsorbiți pe nisip, zeci de ani.

- **Păstrarea culturilor în stare liofilizată.**

Este tehnica cea mai utilizată și avantajoasă, deoarece prelungeste cel mai mult intervalul de conservare a culturilor, fără să producă modificări ale proprietăților lor fiziologice. În cazul mucegaiurilor, o suspensie de spori în lapte degresat se congelează rapid la - 25°C, apoi are loc uscarea în vacuum timp de trei ore în recipiente de sticlă care se închid ermetic și culturile se pot menține 10 ani. Spori aparținând genului *Aspergillus* liofilizați și păstrați astfel la 7°C și-au menținut viabilitatea timp de 23 ani. Bacteriile lactice sunt mai sensibile la păstrare comparativ cu fungii.

8. COLECȚII DE CULTURI

În lume se cunosc colecții de culturi care în marea lor majoritate cuprind culturi protejate prin brevete; dintre acestea colecția NRRL – SUA cunoscută din 1975 cu acronim ARS cuprinde peste 1000 de tulpini în majoritatea lor de actinomicete și mucegaiuri, CBS Fungus Collection – Olanda conține 19300 fungi etc.

În cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați există o micotecă cu acronim MIUG ce include tulpini de drojdii, mucegaiuri, bacterii.

9. FACTORI DE CONTROL AI CREȘTERII MICROORGANISMELOR

Celula microbiană având o masă redusă este puternic influențată de condițiile mediului ambiant și reacționează foarte diferit la diferiți factori, fie prin adaptare sau în caz contrar, prin dispariție. Astfel creșterea microbiană este dependentă de numeroși factori fizico-chimici și biologici ceea ce a condus în cursul evoluției la adaptări specifice prin stabilirea de interrelații între microorganisme și mediu.

Pentru a înțelege modul în care celula microbiană reacționează la condițiile mediului ambiant, diferiți factori au fost împărțiți în mod arbitrar în trei mari grupe, cu precizarea că, în condiții naturale, bioefectul acestora poate fi cumulativ sau sinergic:

1. **Factori extrinseci** sunt factori exogeni, ai mediului natural/industrial: temperatură, umezeală relativă a aerului, concentrația de oxigen, radiații, factori mecanici, factori chimici etc.
2. **Factori intrinseci** sunt factori dependenți de natura alimentului care influențează creșterea și activitatea culturilor starter dar și natura alterării specifice a produselor alimentare (compoziția chimică și concentrația în nutrienți, a_w , pH, rH, structura anatomică, substanțe chimice etc.).
3. **Factori implicați** sunt factori biologici determinați de relațiile ce se pot stabili între diferitele grupe de microorganisme care alcătuiesc microbiota alimentului respectiv.

9.1. INFLUENȚA FACTORILOR EXTRINSECI ASUPRA MICROORGANISMELOR

9.1.1. Temperatura

Temperatura are o mare influență asupra proceselor fiziologice ale celulei microbiene deoarece stimulează sau inhibă activitatea echipamentului lor enzimatic.

În funcție de temperaturile posibile ale mediului natural și ca rezultat al adaptării, diferitele specii de microorganisme prezintă următoarele temperaturi:

- **temperatura minimă** – temperatura la care mai poate avea loc creșterea, în schimb dacă temperatura scade sub valoarea minimă, creșterea este oprită;
- **temperatura optimă** – temperatura la care rata specifică de creștere este maximă;
- **temperatura maximă** - temperatura la care creșterea este încă posibilă dar prin depășirea acesteia efectul devine letal.

În funcție de domeniul specific de creștere, microorganismele se împart în patru categorii:

- **microorganisme psihrofile** – cuprinde specii care cresc bine la 0°C, au o temperatură optimă la 10-15°C și maximă la aproximativ 20°C. Se consideră că aproximativ 90% din microbiota apelor prezintă temperaturi optime la aproximativ 5°C. Din grupa bacteriilor psihrofile de putrefacție fac parte genurile: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*. Microorganismele psihrofile prezintă sisteme enzimatice active la temperaturi scăzute, conțin în membrana plasmatică o concentrație mai mare de acizi grași nesaturați (acid linoleic), ceea ce explică menținerea sa în stare semifluidă la rece și degradarea la temperaturi mai mari de 30°C;
- **microorganisme psihrotrofe** – sunt facultativ psihrofile, au temperatura minimă de creștere la 0°C, cresc bine la 7°C și produc prin păstrare la această temperatură, colonii vizibile sau turbiditate în medii lichide după 7-10 zile de păstrare. Au temperatura optimă între 20-30°C și maximă la 35-40°C. În acest grup sunt incluse bacterii din genurile *Enterobacter*, *Vibrio*, *Listeria* etc., drojii din genul

Candida, genul *Rhodotorula* și mucegaiuri, microorganisme ce pot da alterări ale alimentelor păstrate prin refrigerare;

- **microorganisme mezofile** – reprezintă grupul majoritar, cu temperaturi minime la 15-20°C, temperaturi optime în intervalul 30-40°C și maximum la temperaturi peste 45°C. Cuprinde bacterii, drojdii, mucegaiuri, inclusiv microorganismele patogene pentru om/animale;

- **microorganisme termofile** – sunt microorganisme adaptate să crească la temperaturi mai mari de 45°C; majoritatea au temperaturi optime la 55-65°C și temperaturi maxime 90°C. În cadrul grupului, se diferențiază microorganisme:

- o **preferențial termofile** ($T_m = 25-28^\circ\text{C}$; $T_o = 45-55^\circ\text{C}$; $T_M = 60-65^\circ\text{C}$) din care fac parte bacterii lactice ale genului *Lactobacillus*, unii fungi;
- o **obligat termofile** ($T_m = 37^\circ\text{C}$; $T_o = 50-60^\circ\text{C}$; $T_M = 65-70^\circ\text{C}$) din care fac parte specii ale genurilor *Bacillus* și *Clostridium*, actinomicete.

Microorganismele termofile sunt folosite industrial pentru obținerea de produse lactate acide, a enzimelor termostabile, pentru purificarea apelor reziduale, ca bioindicatori pentru anumite tratamente termice.

9.1.2. Umiditatea

Viața microbiană este posibilă numai când în mediul nutritiv există apă liberă care participă ca solvent, ca mediu de reacție pentru enzimele celulare și pentru transportul bidirecțional al produselor de metabolism. Dacă conținutul de apă liberă intracelulară se reduce, celulele trec în stare de preanabioză, continuată cu anabioză, în care enzimele trec în stare inactivată iar metabolismul este mult redus. În atmosferă există o umezeală relativă de 70-90% și prin păstrarea alimentelor, în timp, în funcție de temperatură și compoziția produsului are loc o absorbție a vaporilor de apă din aer, instalându-se o stare de echilibru, cu creșterea cantității de apă liberă și a indicelui de activitate al apei, a_w . Acesta se poate calcula cu relația:

$$a_w = P/P_0$$

în care:

P – presiunea de vapori a apei din produs;

P_0 – presiunea de vapori a apei pure.

Microorganismele se pot dezvolta într-un domeniu larg de a_w situat între valori de 0,62-0,99 și în funcție de adaptare în raport cu limitele de a_w care le permit creșterea se pot împărți în trei categorii:

- **microorganisme xerofite** – $a_w = 0,62-0,75$; din care fac parte mucegaiuri ale g. *Xeromyces*, g. *Aspergillus*, drojdii osmotolerante, bacterii halotolerante;
- **microorganisme mezofite** - $a_w = 0,75-0,85$; cuprind majoritatea fungilor, bacterii;
- **microorganisme hidrofite** - $a_w = 0,85-0,99$ sunt predominant bacteriile.

Cunoașterea comportării celulelor în raport cu umiditatea ca factor extrinsec ce condiționează cantitatea de apă liberă accesibilă pentru desfășurarea proceselor vitale, se aplică la conservarea prin uscare a produselor alimentare. Dacă acestea se păstrează în condiții în care crește treptat umiditatea, primele microorganisme care se dezvoltă aparțin grupului xerofitelor.

10.1.3. Concentrația în oxigen

Aerul atmosferic conține aproximativ 20% oxigen. Microorganismele necesită oxigen pentru biosinteza compușilor organici și pentru desfășurarea proceselor de oxidoreducere biologice.

În funcție de necesarul în oxigen procurat din aer se disting 5 tipuri de comportare diferențiată a microorganismelor și anume:

- **aerobe** sunt dependente de oxigenul din aer, se dezvoltă la suprafața lichidelor, a mediilor solide. Oxigenul servește ca acceptor final de electroni transportați prin catena respiratorie. Celulele eucariote folosesc oxigenul în sinteza sterolilor și a acizilor grași nesaturați (drojdii, mucegaiuri);
- **facultativ anaerobe**, nu necesită oxigen pentru creștere dar cresc mai bine în prezența sa. Se dezvoltă bine în medii lichide în care solubilitatea oxigenului din aer este mai redusă (bacterii lactice etc.);
- **anaerobe aerotolerante** nu necesită oxigen pentru creștere și cresc la fel de bine în prezența sau absența sa (*Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*);
- **strict (obligat) anaerobe**, nu tolerează oxigenul și mor în prezența acestuia. Nu pot obține energie prin respirație propriu-zisă și folosesc fermentația sau respirația anaerobă în acest scop (bacterii butirice, metanobacterii etc.);
- **microaerofile** – aparțin microorganismele aerobe care necesită concentrații reduse de oxigen pentru creștere, respectiv 2-10%.

9.1.4. Energia radiantă

Lumea vie este bombardată de radiații electromagnetice cu lungimi de undă între 10^{-4} la 10^6 nm; în acest domeniu microorganismele sunt influențate de următoarele radiații:

Radiații ionizante (α , β , γ)

Au lungimi de undă mai mici de 12 nm, o energie radiantă intensă ce acționează prin ionizare cu eliberarea de ioni, radicali liberi ce acționează prin ruperea legăturilor de hidrogen, oxidarea și formarea dublelor legături, modificări în structură, polimerizări. În prezența oxigenului, acțiunea radiațiilor ionizante este amplificată prin generarea de radicali $OH\cdot$ sunt intensificate procese de oxidare, denaturarea ADN-ului, ceea ce conduce la moartea celulei. Eficiența acestor radiații depinde de forma și starea celulei; celulele cu forma coccus sunt mai rezistente decât formele bacilare, iar formele vegetative sunt mai sensibile decât în stare sporulată. Succesiunea în sensul creșterii rezistenței la efectul distructiv al radiațiilor este următoarea:

Bacterii Gram-negative > bacterii Gram – pozitive > fungi > virusuri

Deși efectul radiațiilor ionizante se manifestă asupra tuturor microorganismelor, acestea au o radiosensibilitate diferită care se poate aprecia prin determinarea valorii D_{10} (adică doza absorbită care produce distrugerea a 90% din populația inițială).

Radiații ultraviolete (10-400 nm)

În condiții normale pe Terra nu ajung radiații cu lungimi mai mici de 287 nm deoarece acestea sunt reținute de stratul de ozon protector cu o grosime de aproximativ 40 km. Acest lucru are o semnificație deosebită deoarece radiațiile ultraviolete cu λ între 254-260 nm au efect letal sau mutagen asupra celulelor vii.

Radiațiile ultraviolete în funcție de doză și starea microorganismelor au efect letal maxim la $\lambda = 254$ nm și produc degradarea triptofanului cu formarea de compuși

toxici ce conduc la moartea fiziologică a celulei expuse. Microorganismele pot să-și refacă structura inițială prin fotoreactivare când în prezența luminii sunt activate enzimele care desfac dimerii timinei, sau la întuneric când celula are capacitatea de a elimina porțiunea denaturată. În practică, radiațiile se pot folosi pentru sterilizarea aerului și pentru obținerea de mutații valoroși performanți prin produșii lor de biosinteză.

Radiațiile luminoase (1-10³ nm)

Sunt utile bacteriilor din diviziunea *Photobacteria*. Microorganismele chimiosintetizante preferă să se dezvolte în întuneric. Dintre acestea unele microorganisme pot produce pigmenți cu rol protector ceea ce le permite dezvoltarea în prezența luminii.

Radiații infraroșii ($\lambda > 10^3$ nm)

Acționează prin energie calorică și induc transformări ireversibile ale protidelor.

Energia sonică

Bioefectul ultrasunetelor asupra celulei microbiene este specific și complex depinzând de frecvență, intensitate, durată, densitate de celule etc. Ultrasunetele cu frecvență mare ($>> 1000$ KHz) pot să acționeze producând distrugerea fizică a celulei datorată fenomenului de cavitate ultrasonoră și efectelor electrice/termice asociate. Datorită frecvenței mari pot apare rupturi la nivelul structurilor, apar germeni de cavitație sub forma unor bule mici de gaz care în stadiu de comprimare rezistă la presiuni mari, în faza de expansiune produc implozie determinând distrugereri locale.

La frecvențe mici se observă efectul de stimulare al ultrasunetelor ca urmare a unor deplasări sau deformări ale unor organite intracelulare (lizozomi, mitocondrii) și modificări ale proprietăților plasmalemei cu influență asupra permeabilității și vitezei de transport a nutrienților.

Ultrasunetele de joasă frecvență și intensitate stimulează procesul de înmugurire al drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* ca rezultat al activizării echipamentului enzimatic și a unui contact mai bun al suprafețelor celulelor cu nutrienții mediului.

Ultrasunetele se pot folosi la sterilizarea apei, a saramurilor în industria preparatelor de carne sau pentru distrugerea pereților celulari în scopul extragerii unor compuși valoroși localizați intracelular.

9.1.5. Factori mecanici

Dintre operațiile utilizate în tehnici de analiză microbiologică se aplică frecvent centrifugarea și filtrarea, în scopul separării de celule din medii lichide.

Centrifugarea

Este folosită pentru separarea biomasei de drojdie din medii de cultură când se folosesc viteze de centrifugare de 4000- 6000 rot/min., iar pentru separarea celulelor bacteriene, viteze de 6000-12000 rot/min. Se mai aplică lichidelor ce conțin un număr redus de celule, în vederea concentrării lor în centrifugat și controlul microbiologic.

Filtrarea

Realizează reținerea mecanică a celulelor microbiene atunci când diametrele porilor materialului filtrant sunt mai mici decât dimensiunea acestora. Separarea prin filtrare se mai poate realiza prin adsorbție electrostatică atunci când materialul filtrant cu sarcină pozitivă reține bacteriile cu sarcină negativă. În practica de laborator se

folosește sterilizarea prin filtrarea mediilor de cultură lichide ce conțin în compoziție compuși termolabili (de exemplu vitamine).

Filtrarea se poate aplica pentru determinarea numărului de bacterii din apă sau alte medii lichide când se face filtrarea unui volum determinat din proba de analizat prin membrane filtrante din acetat de celuloză, care rețin celulele. După filtrare, membrana poate servi pentru numărarea directă a celulelor sau poate fi transferată pe suprafața unui mediu nutritiv solidificat repartizat în placă și după termostatare se numără coloniile dezvoltate.

Agitarea. Se aplică la cultivarea microorganismelor în condiții de laborator pentru obținerea culturilor pe agitator sau la cultivarea submersă în condiții industriale, deoarece asigură un mai bun contact între celule și mediul de nutriție și avantajează concomitent aerarea culturii. Rata de agitare la cultivarea submersă în bioreactoare variază cu volumul de mediu și natura microorganismului cultivat. Astfel pentru 1-20 m³ viteza de rotație este de 120-180 rpm, iar la volume de 450 m³ poate fi de 60-120 rpm.

9.1.6. Factorii chimici

Substanțele chimice cunoscute prezintă o mare diversitate de compoziție și se diferențiază în funcție de efectul pe care îl prezintă asupra celulelor microbiene și anume:

- **efect stimulator**, benefic în concentrații mici deoarece numeroase substanțe conțin elemente majore sau minore ce intră în componența compușilor celulari;
- **efect de stagnare a creșterii (microbiostatic)** ca rezultat al acțiunii unor substanțe asupra enzimelor microbiene cu rol în metabolismul celulei vii;
- **efect letal (microbucid)** atunci când substanța, în funcție de doză, conduce la modificări ireversibile și dau distrugerea fizică a celulei sau inactivarea enzimelor, asociată cu moartea fiziologică.

Toxicitatea este caracteristica rezultată din manifestarea biologică a organismului în care a pătruns o substanță toxică și este consecința a două reacții și anume acțiunea toxicului asupra celulei vii și acțiunea celulei asupra toxicului. Din punct de vedere a toxicității și a efectului produs de substanțele chimice cu efect antimicrobian acestea pot fi împărțite în patru grupe:

- **substanțe chimioterapice** – substanțe care au efect negativ asupra microorganismelor patogene și nu sunt toxice pentru organismul uman la dozele la care sunt aplicate în terapeutică. Substanțe ca antibiotice, sulfamide etc. acționează prin activarea enzimelor litice din lizozomi, inhibă sinteza peretelui celular, distrugerea permeabilității membranei plasmatică sau interferează deregând biosinteza polimerazelor cu rol în sinteza acizilor nucleici;
- **substanțe antiseptice** cuprinde un grup mare de substanțe cu rol în combaterea infecției. În medicină, prin antiseptici se înțeleg substanțele toxice pe cale orală pentru organismul uman și care sunt folosite pentru uz extern împotriva patogenilor de infecție (stafilococi, streptococi patogeni etc.);
- **substanțe conservante** – sunt substanțe netoxice pentru organismul uman și în concentrații mici au efect microbiostatic, folosiți în industria alimentară pentru conservarea prelungită a calității produselor alimentare. Numărul conservanților utilizați în industria alimentară este limitat de OMS și FAO în funcție de condițiile pe care acestea trebuie să le îndeplinească și anume: să prezinte un spectru larg de acțiune, să aibă putere microbiostatică la concentrații mici, să fie stabil, solubil, netoxic, economic. Conservanții determină o încetinire a creșterii microbiene

acționând prin inactivarea unor enzime specifice, blocarea unor căi metabolice, prelungind astfel intervalul de timp până se produce alterarea microbiană a produsului;

- **substanțe dezinfectante** – sunt substanțe cu efect microbicid, toxice pentru organismul animal și sunt folosite în industria alimentară pentru dezinfecția utilajelor, a spațiilor de producție, ambalajelor, pentru unele materii prime. Operația de dezinfecție are loc în mai multe etape:

- curățirea cu îndepărtarea materiei organice de pe suprafața ce trebuie dezinfectată;

- aplicarea soluției dezinfectante ce realizează decontaminarea și sanitizarea. Prin decontaminare are loc distrugerea microorganismelor patogene, iar prin sanitizare, reducerea microorganismelor organotrofe la limite la care activitatea lor nu prezintă risc;

- clătirea cu apă potabilă pentru îndepărtarea substanței toxice.

Modul de acțiune a substanțelor chimice folosite în industria alimentară

În funcție de natura substanței și a microorganismelor, efectul substanțelor chimice poate fi:

- **efect microbiostatic** ce se manifestă prin reducerea vitezei de desfășurare a metabolismului și oprirea înmulțirii celulelor;

- **efect microbicid (germicid)** ce este produs de către dezinfectanți ce pot acționa, în general, prin:

- denaturarea ireversibilă a proteinelor și enzimelor produse de acizi anorganici, baze, săruri;
- blocarea grupărilor amino din structura protidelor, aminoacizilor cu formarea de punți metilenice și inactivarea de enzime – aldehida formică;
- permeabilizarea învelișurilor celulare, cu pierderea compușilor intracelulari și pătrunderea substanței toxice – în cazul folosirii de săpunuri, detergenți, săruri cuaternare de amoniu etc.

Factori care influențează efectul antimicrobian al substanțelor chimice

Efectul unei substanțe chimice este condiționat de numeroși factori, biologici, dependenți de substanța chimică și de mediul în care aceasta acționează.

Factori biologici. Efectul unei substanțe chimice este dependent de natura microorganismelor, starea în care se află și numărul de microorganisme prezente în mediul ce urmează a fi conservat. Microorganismele sunt mai sensibile la acțiunea substanței chimice atunci când se află în stare vegetativă și mai rezistente în starea lor sporulată. Celulele tinere, cu un conținut mai mare de apă liberă sunt mai sensibile decât celulele mature. Eficiența este dependentă de numărul de microorganisme în momentul utilizării, deoarece fiecare celulă absoarbe și reține o cantitate din doza existentă. Astfel prin adăugarea unei doze constante, eficiența acestuia se reduce când încărcarea microbiană este mare.

Un factor biologic cu implicații practice este fenomenul de adaptare al microorganismelor la adaosul de substanțe chimice. În practică se utilizează culturi starter adaptate la doze crescute din substanța la care alte microorganisme sunt sensibile. Un exemplu ar fi folosirea de dioxid de sulf în fermentarea mustului de struguri cu drojdi de cultură sulfitorezistente. Pentru a evita adaptarea microorganismelor în practică se recomandă alternarea substanțelor dezinfectante atunci când se constată o reducere a eficienței.

Factori fizico-chimici. Fiecare substanță chimică acceptată în industria alimentară se caracterizează prin:

- **spectrul de acțiune** – reflectă efectul specific sau generalizat. Astfel pentru conservanți acesta poate fi general (fungistatic) sau specific: levuristatic, bacteriostatic, în timp ce pentru dezinfectanți efectul poate fi: microbicid (general), bactericid, virucid, fungicid;

- **puterea antiseptică** – apreciază efectul substanței chimice în raport cu o substanță etalon stabilindu-se astfel o scară de apreciere. Ca substanță etalon se folosește fenolul, cu stabilirea coeficientului fenolic. Puterea antiseptică este dependentă de acțiunea temperaturii și anume cu creșterea temperaturii cu 10 grade a soluției dezinfectante puterea crește de 20 ori; de aceea în industria alimentară dezinfecția se face cu soluții la temperaturi de 60-70°C când eficiența este maximă.

Factori dependenți de mediu. Eficiența substanței chimice depinde de solubilitate și de factorii care o influențează. Substanțele chimice nu trebuie să reacționeze cu componentele mediului. Multe substanțe cu efect antimicrobian nu pot fi folosite ca urmare a faptului că reacționează cu protidele. De exemplu, clorul și hipocloriții își reduc efectul antiseptic dacă se introduc în ape cu grad ridicat de impurificare.

Eficiența substanțelor conservante poate crește ca urmare a unui efect de sinergism, efect cooperant ce permite utilizarea în amestec a mai multor substanțe în concentrații mai mici decât cele necesare pentru a avea aceeași eficiență, la folosirea lor separată.

9.2. INFLUENȚA FACTORILOR INTRINSECI ASUPRA MICROORGANISMELOR

Factorii intrinseci se referă la diferite componente și structură a produselor alimentare care influențează activitatea microorganismelor prezente pe/în produs. În funcție de prezența concomitentă a mai multor factori, din totalul microorganismelor ce pot contamina produsul este favorizată activitatea unui număr restrâns, de obicei 1-4 specii care vor produce și alterarea sa specifică.

Produsele alimentare au o compoziție chimică foarte diversificată și un grad de încărcare cu microorganisme foarte diferit, ce depinde de acela al materiilor prime și auxiliare, de factorii extrinseci ce intervin la prelucrare și păstrare.

Dintre factorii intrinseci, dependenți de alimentul care va reprezenta substratul pentru activitatea microorganismelor (adăugate prin culturile starter sau ocazional contaminante), mai importanți sunt:

9.2.1. Compoziția chimică a alimentelor

Reprezintă un factor important deoarece microorganismele necesită pentru creștere surse de carbon, azot, substanțe minerale, factori de creștere și apă disponibilă. Cu cât alimentul este mai complex cu atât asigură condiții favorabile pentru creșterea mai rapidă, a unui număr mare de microorganisme și este mai alterabil. Produsele alimentare lichide se alterează mai rapid decât cele solide pentru că celulele microbiene vin în contact direct cu nutrienții solubili. Produsele vegetale (fructe, legume) cu un pH acid și lipsite de vitamine din grupul B sunt alterate preferențial de către mucegaiuri care nu necesită factori de creștere și care produc enzime ce pot hidroliza poliglucidele din învelișul lor protector. Produsele bogate în glucide simple sunt de obicei fermentate cu formare de alcooli, acizi, încât prin scăderea de pH este inhibată activitatea bacteriilor de putrefacție care necesită pentru dezvoltare pH neutru. Carnea ce conține cantități importante de substanțe azotate având un pH apropiat de neutru va favoriza dezvoltarea bacteriilor de

putrefacție ce pot folosi protide ca sursă de azot. Alimentele ce conțin lipide vor fi alterate preferențial de microorganisme producătoare de lipaze: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Candida*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Rhizopus* etc.

9.2.2. Structura anatomică

Influențează activitatea microbiană ca urmare a menținerii la distanță a microorganismelor de nutrienți accesibili. Astfel oul se alterează greu, deoarece coaja poroasă și membrana împiedică pătrunderea unor microorganisme. Semințele oleaginoase sau ale cerealelor prezintă un înveliș celulozic protector ce nu poate fi degradat decât de microorganisme celulozolitice. Prin absorbția de apă, acestea suferă mucegăirea deoarece mucegaiurile au condiții favorizante. La fructele cu înveliș ceros, greu penetrabil, alterarea intervine în zone unde se produc leziuni mecanice, înțepături de insecte etc.

10.2.3. Valoarea de pH

Este o proprietate inerentă a unor produse naturale ce conțin cantități ridicate de acizi organici sau dobândesc aciditate prin procese fermentative dirijate (produse conservate prin murare). Microorganismele se dezvoltă în limite largi de pH (între 1,5-11). În acest interval microorganismele acidotolerante – drozdii, mucegaiuri, bacterii lactice și acetice preferă pH 2,5-5,5 și se vor dezvolta în produse acide care pot suferi fermentația și mucegăirea. Bacteriile de putrefacție care preferă un pH = 7 nu se pot dezvolta în medii acide care sunt astfel protejate.

Acțiunea pH-ului asupra creșterii se poate observa în mediu, deoarece disponibilitatea unor nutrienți este modificată de echilibrul ionic. Astfel la pH acid ionii de magneziu formează complexe insolubile, în timp ce la pH bazic sunt complexați ionii de calciu, zinc și ionii ferici, elemente cu rol de cofactori ai enzimelor microbiene. Valori extreme de pH influențează permeabilitatea membranelor celulare. În mediu acid permeazele cationice sunt saturate de ioni de H⁺ care limitează sau anulează transportul cationilor indispensabili pentru celule; în mediu alcalin membrana este saturată cu OH⁻ și este împiedicat transferul de anioni necesari. La modificări de pH se modifică și cinetica reacțiilor enzimatică care se desfășoară optim la anumite valori specifice. Microorganismele patogene, de exemplu *Clostridium* sunt mai sensibile decât cele din genul *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*. *Clostridium botulinum* are pH-ul minim pentru producerea de neurotoxine egal cu 4,8, iar la *Staphylococcus aureus* pH minim pentru creștere este de 4,2.

9.2.4. Valoarea de rH

Este dependentă de prezența în aliment a substanțelor cu caracter oxidant sau reducător.

Alimentele cu potențial de oxidoreducere scăzut (rH = 0-12), de exemplu laptele, favorizează dezvoltarea substanțelor anaerobe, în timp ce fructele cu rH ridicat (18,5 -28) favorizează dezvoltarea microorganismelor aerobe. Diverse lichide cu valori medii de rH (12-18,5) permit activitatea fermentativă a drozdiilor, bacteriilor lactice.

9.2.5. Indicele de activitate al apei (a_w)

Reflectă conținutul de apă liberă din produsele alimentare pusă la dispoziția microorganismelor pentru reacții chimice, biochimice, transfer de metaboliți prin învelișurile celulare.

Domeniul general de a_w pentru dezvoltarea microorganismelor este 0,62-0,99; cele mai pretențioase sunt bacteriile care necesită cantități mari de apă liberă, în timp ce drojdiile osmotolerante și mucegaiurile xerofite se dezvoltă la valorile minime ale domeniului. Între conținutul de umiditate al produselor alimentare determinat prin uscarea la etuvă la temperaturi de 105°C până la masă constantă și indicele de a_w nu se pot stabili relații de dependență. Este important de precizat că:

- indiferent de temperatură, capacitatea microorganismelor de a crește este redusă, când a_w este scăzut;
- domeniul de a_w la care creșterea are loc este cel mai extins la temperatura optimă de creștere;
- prezența nutrienților necesari în aliment crește domeniul de a_w în care microorganismele pot supraviețui.

Substanțe naturale cu efect antimicrobian. Unele produse vegetale folosite în alimentație conțin substanțe denumite fitoncide. Astfel ceapa conține alicina, usturoiul – alil sulfonatul, de asemenea conțin fitoncide: hreanul, muștarul, cuișoarele, scorțișoara etc. Unele fructe pot conține benzoat, salicilat (este cazul fructelor de pădure). În produse de origine animală, în ouă este prezent lizozimul, în lapte proaspăt este prezent pe lângă lizozim, lactenine, lactoperoxidază. Desigur că aceste substanțe au un spectru specific și pot influența numai activitatea microorganismelor sensibile.

9.3. INFLUENȚA FACTORILOR IMPLICIȚI

Inter-relațiile ce pot apărea în condiții naturale între microorganisme care trăiesc în același mediu, sau pe același aliment sunt foarte complexe. Din cauza proprietăților variate ale diferitelor specii și a intensității cu care decurg procesele lor metabolice, aceste relații au un rol important asupra vieții microorganismelor și indirect asupra modificărilor pe care le suferă alimentele. În biotehnologii alimentare în care se folosesc culturi mixte de microorganisme aflate într-un anumit raport cantitativ, procesul tehnologic este astfel dirijat încât să fie favorizată multiplicarea sau formarea anumitor produse de metabolism. Calitatea produselor finite și conservabilitatea lor este dependentă de corelații care se stabilesc între microorganismele existente la un moment dat pe alimentul care le asigură necesitățile nutritive.

Dintre relațiile ce se pot stabili între diferite grupe de microorganisme mai importante sunt următoarele:

Neutralismul

Corespunde unor relații de indiferență între două sau mai multe specii de microorganisme atunci când acestea se deosebesc mult prin exigențele nutritive. Foarte puține specii sunt strict neutrale, de obicei se formează asocieri care au caracter temporar sau accidental, reacționând unele față de altele în mod favorabil și sinergic sau dimpotrivă, antagonic.

Mutualismul (simbioza)

Reprezintă un tip de relație care permite dezvoltarea simultană pe un substrat comun a unor specii diferite care exercită una asupra alteia o influență bilateral favorabilă. Un exemplu îl oferă bacteriile lactice și drojdiile folosite în culturi mixte la fabricarea produselor lactate acide, la prepararea maielelor în panificație. Drojdiile produc vitamine ale grupului B care sunt factori de creștere pentru bacteriile lactice iar acestea produc acid lactic care le asigură un pH optim pentru activitatea lor.

Comensalismul (metabioza)

Este caracterizat prin creșterea împreună a două sau mai multor specii de microorganisme aflate într-o relație în care una profită de asociere iar cealaltă în aparență nici nu profită nici nu este influențată negativ.

Comensalismul se realizează fie prin elaborarea de către unul din parteneri a unor substanțe care favorizează dezvoltarea celorlalți, fie prin modificarea mediului care devine mai favorabil pentru speciile asociate. Se întâlnesc frecvent la păstrarea laptelui, la fermentarea lactică a produselor vegetale, la fabricarea vinului, a brânzeturilor etc.

Sinergismul

Este o relație de tip cooperant în care două sau mai multe specii produc împreună un efect pe care în mod izolat nu îl pot realiza. De exemplu, putrezirea lemnului este posibilă numai prin asocierea cooperantă a mucegaiurilor și a bacteriilor celulozolitice.

Antagonismul

Se manifestă sub forma unor corelații complexe între grupe de microorganisme în care una din specii se comportă ca agresor și profită de pe urma asociației cu celelalte specii care sunt prejudiciate. Se consideră că nu există microbi fără antagoniști.

Fenomenul de antagonism microbial poate fi datorat mai multor cauze:

- viteză diferită de creștere și multiplicare a speciilor antagonice. Atunci când mediul conține substanțe accesibile tuturor microorganismelor de obicei predomină bacteriile care au un timp de generație mai mic decât cel al fungilor;
- insuficiența în mediu a substanțelor nutritive. În medii cu un conținut redus într-o substanță utilă aceasta este consumată de specia cea mai adaptată la mediu;
- acțiunea unor substanțe de metabolism ce pot produce un antagonism nespecific atunci când efectul se exercită asupra tuturor asociațiilor, de exemplu acidul lactic format prin fermentație inhibă prin reducerea de pH activitatea tuturor bacteriilor de putrefacție, sau un antagonism specific când substanța produsă (de exemplu, antibiotice) au efect selectiv asupra unui grup restrâns.

În tabelul de mai jos se dau grupe de microorganisme aflate în relații de antagonism:

Tabelul nr.1. Relații antagonice între microorganisme

Microorganisme patogene	Microorganisme antagonice
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Bacillus subtilis, Lactobacillus sp.</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium sporogenes, Lactobacillus sp.</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus, Pseudomonas, Enterobacter</i>
<i>Salmonella</i>	<i>Escherichia coli</i>

Parazitismul reprezintă un tip de relație antagonică în care un microorganism se dezvoltă pe seama celuilalt. Se manifestă prin liza celulelor microbiene ca rezultat al acțiunii fagilor (bacteriofagi, micofagi).

Cunoașterea factorilor implicați care determină creșterea și multiplicarea microorganismelor aflate în produse alimentare permite alegerea condițiilor optime la utilizarea culturilor mixte și dirijarea relațiilor microbiene în scopul asigurării calității alimentelor.

10. PROCESE METABOLICE ALE MICROORGANISMELOR ȘI APLICAȚII ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ

10.1. METABOLISMUL MICROBIAN – FUNCȚII DE BAZĂ

Viața celulei microbiene în condiții compatibile cu aceasta este determinată de caracterele genetice care îi imprimă un anumit metabolism, determinat de totalitatea reacțiilor biochimice catalizate secvențial de enzimele celulei vii, prin care se asigură transferul de masă și energie între celulă și mediul ambiant. Viața microorganismelor, continuitatea lor genetică este asigurată de desfășurarea concomitentă a celor două laturi independente ale metabolismului și anume catabolismul și anabolismul.

Catabolismul

Denumit și metabolism degradativ este rezultatul reacțiilor biochimice catalizate enzimatic prin care compușii macromoleculari sunt transformați în produși ușor asimilabili cu eliberarea concomitentă a energiei potențiale a compușilor cu rol de nutrient (reacții exergonice).

Anabolismul

Denumit și metabolism constructiv, de biosinteză, reprezintă totalitatea reacțiilor biochimice endergonice catalizate de enzime, prin care se realizează biosinteza compușilor celulari, creșterea și reproducerea microbiană.

Microorganismele au potențialul genetic de a codifica și de a sintetiza peste 1000 de tipuri de enzime care catalizează specific, căi metabolice proprii. Echipamentul enzimatic complex al celulei microbiene este alcătuit din enzime constitutive sintetizate în mod necondiționat și obligatoriu în toate celulele microbiene și enzime adaptive (inductive) sintetizate în mod condiționat, când mediul ambiant prin nutrienții oferii impune adaptarea.

10.2. FERMENTAȚIA ALCOOLICĂ

Fermentația alcoolică este un proces anaerob prin care glucidele fermentescibile sunt metabolizate prin reacții de oxidoreducere sub acțiunea echipamentului enzimatic al drojdiei în produșii principali (alcool etilic și CO₂) iar ca produși secundari: alcoolii superiori, acizi, aldehide etc.

Agenții tipici ai fermentației alcoolice sunt drojdiile genului *Saccharomyces* care pot să producă prin fermentarea glucidelor mai mult de 8° alcool etilic.

Fermentația alcoolică este un proces întâlnit la numeroase microorganisme, dar care produc prin fermentare cantități mai reduse de alcool etilic comparativ cu drojdiile. Astfel mai pot produce alcool etilic bacteriile: *Bacillus macerans*, *Zymomonas*, dar ele nu sunt considerate agenți tipici.

Proprietăți biotehnologice ale drojdiilor fermentative. Pentru a putea fi folosite în practică drojdiile genului *Saccharomyces* sunt studiate și selecționate în funcție de unele proprietăți care le recomandă pentru utilizare industrială, cum ar fi:

Puterea alcooligenă care se referă la concentrația maximă de alcool ce se poate acumula când în mediu există un exces de zahăr. Drojdiile sunt sensibile la creșterea concentrației în alcool și în timp ce drojdiile cu putere alcooligenă slabă (*Kloeckera*, *Torulopsis*) sunt inhibitate la o concentrație în alcool de 4-6° drojdiile de vin și alcool (*Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces cerevisiae*) au o putere alcooligenă mare și continuă fermentația alcoolică până se acumulează 16-18° alcool.

Alcoolerezistența se referă la capacitatea drojdiei de a continua fermentația la creșterea concentrației de alcool.

Sulfiterezistența este capacitatea drojdiilor de vin de a produce fermentația alcoolică în prezența unor concentrații de 200-500 mg SO₂/dm³ care pot influența

negativ activitatea altor drojdii din must neadaptate (peliculare sau oxidative) ca urmare a scăderii potențialului de oxidoreducere.

Capacitatea de floculare și pulverulența – proprietăți datorate structurii peretelui celular și a modificării de pH și rH din timpul fermentației. Drojdiile floculante pot forma asociații ce se depun mai ușor, în timp ce drojdiile pulverulente se mențin mai mult timp în suspensie și produc o fermentație mai avansată.

Osmotoleranța se referă la capacitatea drojdiilor de a produce fermentația în mediu cu o concentrație crescută de zahăr. Aceste proprietăți sunt recomandate drojdiilor folosite la obținerea alcoolului din melasă cu un randament superior în alcool etilic.

Caracterul killer este întâlnit la unele drojdii capabile de a sintetiza intracelular o toxină cu efect inhibitor asupra altor drojdii sensibile. În selecționarea drojdiilor de vin culturile care au caracter killer dau randamente superioare, în cursul fermentației are loc o autoselecție naturală.

Factorii care influențează dinamica fermentației alcoolice

Fermentația alcoolică în condiții industriale folosește substraturi naturale bogate în zahăr fermentescibil, iar viteza de fermentare și transformare a glucidelor în produși primari și secundari este dependentă de numeroși factori care pot fi împărțiți în două mari categorii: factori biologici, dependenți de microagenții fermentării și factori fizico-chimici, dependenți de compoziția mediului supus fermentării și condițiile mediului ambiant.

1)Factorii biologici

Încă din 1885-1887 a fost stabilit de către Ed. Büchner că fermentația alcoolică este cauzată de enzimele elaborate de celula de drojdie, stabilindu-se natura enzimatică a fermentației.

Complexul zimazic acelular obținut prin mojararea celulelor de drojdie este format din 15 enzime care catalizează în diferite etape procesele de oxidoreducere ale glucidelor fermentescibile și în final formarea de alcool etilic.

Fermentația decurge activ când celulele de drojdie sunt în faza exponențială sau la începutul fazei staționare de creștere, în timp ce drojdiile autolizate, ca rezultat al hidrolizei proteinelor intracelulare și inactivarea enzimelor, își pierd proprietățile fermentative.

Viteza de fermentare depinde și de numărul de celule/cm³ mediu; viteza crește cu numărul de celule, prin viteză înțelegând conținutul de alcool format la 100 cm³ lichid în unitatea de timp. În practică, din rațiuni economice, prin folosirea culturilor starter în industriile fermentative, concentrația de celule pentru declanșarea rapidă a fermentației este 10⁶-10⁹/cm³.

Un alt factor îl constituie spectrul de fermentare al glucidelor. Din studiul caracterelor fiziologice se cunoaște că drojdiile produc fermentarea unui număr limitat de glucide ce pot fi transformate în alcool etilic și CO₂ în condiții anaerobe, între specii existând diferențe.

Datorită importanței pe care o prezintă alcoolul etilic de fermentare în practica industrială, în afara glucidelor fermentescibile se pot folosi substraturi naturale ce conțin poliglucide (amidon, celuloză) care sunt hidrolizate în prealabil pe cale chimică sau enzimatică până la formarea de glucide fermentescibile. Această zaharificare este obligatorie deoarece drojdiile de fermentare nu produc amilaze/celulaze și nu pot produce hidroliza enzimatică a poliglucidelor.

Dacă mediul de fermentare este puternic aerat, atunci are loc efectul Pasteur, prin care se observă conversia fermentației în respirație deoarece în prezența

oxigenului, oxidarea se face până la produși finali (CO_2 și H_2O), iar cantitatea de energie este mult mai mare, pentru același echivalent energetic consumându-se o cantitate mică de zahăr.

1 mol glucoză \rightarrow 2 ATP (fermentație)

1 mol glucoză \rightarrow 36 ATP (respirație)

Procesul de aerare este folosit la cultivare atunci când interesează obținerea unei cantități mai mari de drojdie, de exemplu la obținerea industrială a drojdiei comprimate sau a drojdiei furajere.

2) Influența factorilor fizico-chimici asupra fermentației alcoolice

Compoziția mediului de fermentare. Diferitele componente ale mediului pot fi metabolizate în mod diferit. De aceea, mai ales la vinuri, în funcție de calitatea mustului, care este influențată de soiul și gradul de coacere a strugurilor, apar diferențe de aromă.

Concentrația în zahăr influențează direct proporțional viteza de fermentare atunci când se situează în limitele 5-12% (50-120 g zahăr/dm³). Cu creșterea concentrației de zahăr anumite drojdii mai sensibile suferă o inhibare în activitate prin procese de represie catabolică sau prin modificări la nivel de membrană datorate plasmolizei. Drojdiile de fermentare au în general osmotoleranță și de aceea produc fermentarea în bune condiții a mustului de struguri cu o concentrație de 170-250 g zahăr/dm³.

Concentrația în alcool. În mediile fermentative cu microbiotă naturală, dacă se ajunge la o concentrație alcoolică de 4-6°, se produce o încetinire a fermentației la drojdia care nu are rezistență la alcool (*Kloeckera*, *Torulopsis*, *Hansenula*), iar fermentarea este continuată de drojdia alcoolerezistentă, acumulându-se 18-20° alcool (1 grad alcoolic = 1 ml alcool absolut/100 ml mediu fermentat).

PH-ul are un rol important în formarea compușilor de fermentare, în funcție de pH cunoscându-se două forme ale fermentării: fermentarea alcoolică propriu-zisă, ce se desfășoară la pH 3,5-5 când produsul principal este alcoolul etilic și dioxidul de carbon, cu produși secundari în cantități mici, echilibrate și fermentarea la pH alcalin, când în afară de alcool etilic și dioxid de carbon se formează în cantitate mai mare glicerol (până la 30% din zahărul fermentat).

Temperatura. Enzimele componente ale sistemului zimazic prezintă fiecare un optim de activitate, iar proprietățile sunt determinate genetic de caracterele de specie. Fermentarea alcoolică poate avea loc între 0-35°C. În funcție de specia de drojdie predominantă sau folosită în cultură pură temperaturile optime sunt la:

- 28-30°C, pentru drojdia de alcool și de panificație (*Saccharomyces cerevisiae*);
- 6-12°C, pentru drojdia de bere (*Saccharomyces carlsbergensis*);
- 15-20°C, pentru drojdiile de vin (*Saccharomyces ellipsoideus* și *Saccharomyces oviformis*), care produc o fermentare mai lentă la aceste temperaturi, dar conduc la obținerea unui vin de calitate deoarece la temperaturi mai scăzute se evită pierderile de substanțe volatile.

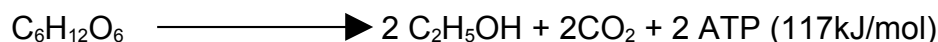
Biochimismul formării produșilor principali și secundari în fermentația alcoolică propriu-zisă

Conversia prin fermentare în mediu acid a glucidelor, catalizată de enzime din drojdia se desfășoară în cinci etape principale:

- transformarea diferitelor tipuri de glucide în esteri ai glucozei și formarea esterului fructo-furanozo-1,6-difosfat. Este etapa în care se consumă energie prin transformarea ATP-ului în ADP;
-

- formarea triozelor-aldehidă fosfoglicerică și fosfodioxiacetonă;
- transformarea triozelor până la formarea de acid piruvic. Energia eliberată prin procesul de oxidoreducere este înmagazinată prin fosforilare de substrat;
- decarboxilarea acidului piruvic și formarea de aldehydă acetică;
- aldehyda acetică se reduce devenind acceptor de hidrogen și se formează alcoolul etilic.

Reacția globală a fermentației alcoolice în mediu acid:



Formarea produșilor secundari

În fermentația alcoolică rezultă o diversitate de produse secundare. În vinuri au fost identificate prin cromatografie 300-500 de substanțe diferite. Majoritatea lor rezultă prin fermentare, iar celelalte sunt dependente de compoziția mediului.

Glicerolul se acumulează în mod normal în cantități de 3,3 g/100 g glucoză fermentată și are un rol benefic asupra calității vinului, conferindu-i „catifelaj”-ul.

Aldehydele se acumulează în mediul de fermentare. Cea mai importantă, aldehyda acetică, la concentrații ce depășesc 2,5 mg/dm³ influențează indirect gustul, deoarece prin oxidări duce la formarea de acid acetic.

Acizii provin atât din must cât și din procesul fermentativ. Ei dau aciditate volatilă vinului (acid acetic, formic, propionic, butiric) precum și o aciditate fixă (acid lactic, succinic) care se regăsește în aciditatea totală a vinului.

Dintre alcoolii superiori, care se acumulează mai ales la fabricarea alcoolului, fac parte alcoolii amilic, izoamilic, propanol, butanol, care pot să contribuie la formarea unor substanțe de aromă.

La fabricarea vinului alcoolii superiori sunt precursori de aromă deoarece se pot combina cu diferiți acizi rezultând esteri cu aromă caracteristică. De exemplu, în vinuri, din fenilalanină se formează alcoolul feniletic care dă aromă de trandafir.

În afară de aspectele pozitive ale fermentației alcoolice la fabricarea alcoolului, vinului, distilatelor, berii, pâinii, poate prezenta și aspecte negative atunci când se produce fermentarea spontană a unor produse bogate în zahăr (siropuri, dulcețuri, compot, miere). În acest caz fermentarea este dată de drojdii osmotolerante care produc prin fermentare alcool etilic, CO₂ și o cantitate apreciabilă de acid acetic, ceea ce duce la deprecierea lor.

Fermentații alcoolice neconvenționale, produse de bacterii

Există bacterii care pot produce cantități apreciabile de alcool: *Bacillus macerans*, *Leuconostoc*, *Clostridium acetono-etillicus*, iar *Zymomonas mobilis* și *Zymomonas anaerobica*, produc prin fermentare 10°-16° alcool. Cu aceste bacterii pot fi fermentate derivatele celulozice, pentru obținerea de alcool carburant.

Cu ajutorul bacteriilor se obține alcool cu întrebuințări industriale, care nu este folosit în alimentație deoarece bacteriile nu produc și substanțe secundare de aromă, iar randamentul de conversie este mai mic decât al drojdiilor.

10.3. FERMENTAȚIA LACTICĂ

Fermentația lactică este un proces anaerob prin care glucidele fermentescibile sunt metabolizate sub acțiunea echipamentului enzimatic al microorganismelor în acid lactic ca produs principal și ca produse secundare: diacetil, acetoină, acid acetic, alcool etilic și CO₂.

Calea metabolică de producere a acidului lactic este frecvent întâlnită în lumea microbială, în schimb randamente superioare de conversie a glucidelor în acid lactic sunt întâlnite la bacterii și mucegaiuri. Dintre acestea, bacteriile lactice, considerate agenți tipici ai fermentației sunt folosite industrial în biotehnologii alimentare, la industrializarea laptelui și a cărnii, în panificație, la conservarea produselor vegetale și la obținerea acidului lactic.

Mucegaiuri selecționate ale genurilor: *Aspergillus*, *Penicilium* și *Mucor* pot fi cultivate submers cu aerare dirijată, pentru obținerea industrială a acidului lactic.

Caractere morfo-fiziologice generale ale bacteriilor lactice

Bacteriile lactice sunt foarte răspândite în natură în diferite biotopuri: aparatul foliar al plantelor, în microbiota intestinală, în cavitatea bucală, în microbiota pielii.

Caractere morfologice

Bacteriile lactice prezintă eterogenitate morfologică: principalele forme sunt derivate de la coccus, și se pot prezenta sub formă de streptococi (g. *Lactococcus* și g. *Streptococcus*), de diplococi (g. *Leuconostoc*), de tetrade (g. *Pediococcus*); numeroase alte bacterii lactice se prezintă sub formă cilindrică, de bastonașe cu dimensiuni variabile, izolate sau în lanțuri lungi, incluse în genul *Lactobacillus*.

Caractere fiziologice

Bacteriile lactice sunt pretențioase din punct de vedere nutritiv și înmulțirea lor are loc în medii cu compoziție chimică complexă.

10.4. FERMENTAȚIA PROPIONICĂ

Fermentația propionică este un proces anaerob prin care substratul fermentescibil, acidul lactic, sub acțiunea complexului de enzime ale bacteriilor propionice – agenții tipici – este transformat în acid propionic, acid acetic, CO₂ și energie.

În afara bacteriilor propionice (g. *Propionibacterium*), formarea prin catabolism a acidului propionic este întâlnit la bacterii anaerobe ale g. *Clostridium* (*Clostridium propionicum*) și g. *Veillonella*.

Bacteriile propionice sunt răspândite în natură în tractul digestiv al animalelor, în lapte și brânzeturi din care pot fi izolate.

Biochimismul fermentației propionice

În fermentația propionică, substratul fermentescibil (acidul lactic) este metabolizat anaerob, conform reacției generale:



Aspecte practice ale fermentației propionice

Fermentația propionică dirijată este folosită la fabricarea brânzeturilor (Schweitzer, Ementhal), cu rol pozitiv în formarea ochiurilor (alveole rezultate prin difuzia lentă a CO₂, rezultat din fermentație sau prin decarboxilarea aminoacizilor), în formarea gustului specific și creșterea valorii alimentare, ca urmare a formării de către bacteriile propionice a vitaminei B₁₂.

În industria panificației, fermentația propionică produsă de bacterii propionice adaptate la mediul aluat, conduce la formarea suplimentară a CO₂ cu rol în creșterea volumului și a acidului propionic cu efect fungistatic ce previne mucegăirea pâinii la păstrare.

10.5. FERMENTAȚIA BUTIRICĂ

Fermentația butirică reprezintă un proces anaerob prin care diversele surse de carbon sunt metabolizate sub acțiunea bacteriilor butirice în produși principali ai fermentației: acid butiric și gaze: CO₂; H₂. În funcție de specie și condiții de fermentare se mai pot forma pe căi deviate de la fermentația butirică propriu-zisă solvenții: butanol, propanol, etanol, acetonă.

Biochimismul fermentației butirice

Are loc după ecuația generală:



Fermentația butirică se poate folosi industrial la fabricarea acidului butiric. În acest scop se folosesc plămezi amidonoase zaharificate cu enzime din malt, se face inocularea cu *Clostridium butyricum* și fermentarea are loc anaerob, la 35-40°C timp de 8-10 zile, în prezență de carbonat de calciu. Pentru obținerea acidului butiric, în plămada fermentată se adaugă sulfat de sodiu. Butiratul de sodiu se separă de sulfatul de calciu prin filtrare și după concentrare, în prezență de acid sulfuric se eliberează acidul butiric.

Acidul butiric sub formă esterificată este folosit la fabricarea unor esențe, deoarece butiratul de metil are aromă de măr, iar butiratul de etil, aromă de pară sau ananas, esențe folosite la obținerea produselor zaharoase.

Fermentația butirică, atunci când are loc la fabricarea sau conservarea produselor alimentare, influențează negativ calitatea acestora.

Fermentația butirică poate fi ocazional detectată la fabricarea alcoolului din materii amidonoase, când acidul butiric rezultat are un efect inhibitor asupra drojdiilor, agenți ai fermentației alcoolice.

Dacă fermentația butirică spontană are loc în spații închise, gazele generate prin fermentație pot deveni explozive.

Bacterii ale genului *Clostridium* pot fi agenți de alterare a conservelor, alterare caracterizată prin bombaj și pierderea valorii alimentare.

10.6.PROCESE METABOLICE AEROBE (FERMENTAȚII OXIDATIVE)

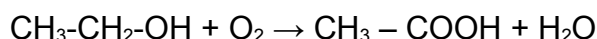
Spre deosebire de fermentațiile propriu-zise anaerobe, fermentațiile acetică, gluconică, citrică etc. sunt procese oxidative simple, care se desfășoară în condiții aerobe și se diferențiază de metabolismul oxidativ (respirație), prin aceea că oxidarea este limitată, rezultând în condiții industriale acizi organici cu mare valoare economică.

10.6.1.Fermentația acetică

Fermentația acetică este un proces metabolic aerob prin care substratul (alcoolul etilic) este oxidat în prezența oxigenului din aer, sub acțiunea echipamentului enzimatic al bacteriilor acetice, în acid acetic ca produs principal al fermentației.

Biochimismul fermentației acetice

Fermentația acetică se desfășoară după reacția globală:



Alcoolul etilic este oxidat în aldehydă acetică în prezența alcool-dehidrogenazei. Are loc legarea chimică a unui mol de apă și se formează acetaldehida-hidratată care în prezența aldehyd dehidrogenazei cedează 2H⁺ care

este transferat de către enzime ale catenei respiratorii celulare pe oxigenul molecular și se acumulează acid acetic – produs principal al fermentației.

Importanța practică a fermentației acetice

Deoarece obținerea vinului se cunoaște de peste 10000 de ani, se presupune că și obținerea oțetului are aceeași vechime. Obținerea industrială este descrisă din 1670 și în prezent producția anuală depășește 106 t acid acetic pur, obținut prin fermentarea diferitelor materii prime: soluții alcoolice, vin, cidru, malț, bere, orez. În cazul materiilor amidonoase, se face în prima etapă zaharificarea, apoi fermentația alcoolică cu drojdii și în final are loc acidificarea cu bacterii acetice selecționate. Consumul pe cap de locuitor și an poate varia între 0,2-38 l.

Fermentația acetică spontană, întâlnită la fermentarea boabelor de cacao are un rol pozitiv în formarea compușilor de aromă și obținerea unor boabe de calitate superioară.

Bacteriile acetice *Acetobacter xylinum* pot fi folosite pentru obținerea de β glucani folosiți la fabricarea de membrane filtrante pe bază de acetat de celuloză.

Gluconobacter suboxidans poate fi folosit pentru oxidarea manitolului în fructoză și a glicerolului în dehidroxi-acetonă folosită în cosmetică.

Importanța practică o are și oxidarea sorbitolului și formarea de L-sorboză, materia primă în sinteza acidului L-ascorbic (Vitamina C).

Fermentația acetică nedorită a vinului, berii, păstrate cu „gol de aer” conduce la deprecierea calității lor. În cazul vinurilor, procesul este considerat o boală, deoarece acrirea are loc în întregul volum, deși bacteriile acetice aerobe se dezvoltă la suprafață. Acidul acetic format sub voal are o densitate mai mare decât a alcoolului încât se produce o circulație a compușilor reactanți care conduce la acrirea totală a produsului.

10.6.2. Fermentația gluconică

Fermentația gluconică este un proces oxidativ simplu prin care glucoza, în prezența oxigenului din aer și a sistemului enzimatic al microorganismelor selecționate este transformată în acid gluconic ca produs principal.

Agenții tipici ai fermentației gluconice sunt bacteriile din genul *Gluconobacter* (*Acetomonas*), genul *Moraxella* și mucegaiuri din genul *Aspergillus*: *A.niger*, *A.phoenicis*, *A.wenti* și ale genului *Penicillium*: *P.chrysogenum*, *P.luteum*.

Importanța practică a fermentației gluconice

Acidul gluconic se obține pe cale fermentativă cu culturi fungice folosind ca substrat melasă diluată (10-20 % zaharoză), repartizată în tăvi cu suprafață mare. După inoculare cu spori ai mucegaiului selecționat acesta se dezvoltă la suprafață formând o Dermă groasă se produce lent oxidarea glucozei rezultată prin inversia zaharozei. Procedeele sunt lente și în ultimii ani a fost înlocuit cu metode submerse de aerare, în bioreactoare în care procesul este accelerat și randamentul de conversie al glucozei în acid gluconic este de 80-90% în timp de 18 ore la 25-30°C și pH=3. Prin adăugare de carbonat de calciu se formează gluconatul de calciu, din care prin procedee chimice se purifică acidul gluconic.

Biomasa rezultată în perioada fermentării poate fi valorificată pentru recuperarea glucoxidazei intracelulare. Dintre multiplele aplicații ale acidului gluconic, mai importante sunt următoarele:

- folosirea gluconatilor de Ca, Fe, în terapeutică;
- la obținerea prafului de copt;

- gluconolactona, produs intermediar al fermentației este folosit în industria preparatelor de carne, deoarece le conferă un gust acrișor, împiedică activitatea bacteriilor de putrefacție și menține culoarea roșie naturală a compoziției salamurilor;
- acidul gluconic în amestec cu soda caustică este folosit pentru îndepărtarea rapidă a sărurilor insolubile de magneziu;
- acidul 2 ceto-gluconic este folosit la obținerea acidului D-araboascorbic – substanță cu efect antioxidant folosit la prevenirea rănecizării alimentelor cu conținut ridicat în lipide.

10.6.3. Fermentația citrică

Fermentația citrică este un proces oxidativ complex prin care substratul glucidic (zaharoza) este metabolizat la compuși intermediari de oxidare cu acumulare în mediu a acidului citric ca produs principal.

Agenții tipici ai fermentației citrice sunt tulpini selecționate ale speciei *Aspergillus niger* care produc activ citrat sintetază. Acidul citric se poate obține cu un bun randament (52 g/dm³) și prin cultivarea drojdiilor cu specia *Candida oleophilla*, pe medii cu parafine.

Pentru creșterea randamentului în acid citric, când pentru fermentație se folosește ca materie primă melasa, aceasta se tratează cu ferocianură de potasiu pentru îndepărtarea prin precipitare a Mg, Fe, Mn, Zn, CU, metale care influențează acumularea de acid. Ca rezultat al eliminării acestora, crește activitatea enzimei de condensare, în schimb enzime ale ciclului Krebs: aconitat – hidrataza care necesită fier și izocitrat dehidrogenaza care necesită mangan, în absența cofactorilor trec în stare inactivă și deci este oprită secvența biochimică de transformare a acidului citric prin ciclul Krebs și astfel acesta se acumulează în mediul de cultură.

Producerea industrială a acidului citric

Prin culturi de suprafață pe medii cu melasă diluată tratată cu ferocianură de potasiu, după sterilizare și răcire în tavă, se inoculează cu spori de *A.niger* (3-4 g spori/100 m² suprafață mediu) și fermentarea are loc la 30-35°C. La suprafață se dezvoltă o Dermă cu suprafață cutată prin creșterea aerobă a miceliului vegetativ și reproducător. Fermentația durează 6-8 zile cu un randament de conversie a zaharozei în acid citric de 70-72% (1 m² suprafață miceliu poate să producă 500-800 g acid citric în 24 ore). După separarea biomasei, aceasta poate fi valorificată ca sursă de enzime/proteine, iar din mediul fermentat prin metode fizico-chimice se separă acidul citric cristalizat.

Acidul citric se poate obține și prin metode submerse în bioreactoare cu aerare dirijată, prin procedee discontinue sau continue, cu reducerea duratei de fermentație și creșterea randamentului la valori de 80-85% în acid citric.

Importanța fermentației citrice

Acidul citric este principalul acid folosit în industria alimentară, pentru fabricarea băuturilor răcoritoare, a produselor zaharoase.

Este folosit în calitate de conservant al culorii produselor păstrate în stare congelată, are proprietăți antioxidante și rol de anticoagulant al sângelui.

În industria farmaceutică intră în componența pulberilor efervescente.

Citratul de sodiu este recomandat în compoziția detergentilor, înlocuind fosfații, care prin deversare în ape favorizează proliferarea excesivă a algelor.

Acidul citric sub formă cristalizată prin încălzire la 170°C se transformă în acid itaconic utilizat la fabricarea rășinilor schimbătoare de ioni.

10.6.4. Fermentații oxidative diverse

Prin fermentații oxidative (aerobe) se mai pot obține și alți acizi, de exemplu: acidul fumaric cu culturi din g. *Aspergillus*, *Penicillium*, important pentru obținerea aldehidei maleice, materie primă pentru obținerea rășinilor sintetice.

Acidul kojic obținut prin cultivarea lui *Aspergillus oryzae* este folosit ca reactiv în chimia analitică și intră în compoziția unor insecticide.

Acidul ustilagic obținut cu culturi de micromicete ale genului *Ustilago* este folosit în industria parfumurilor.

Este important de subliniat că fermentațiile pot avea loc în mod spontan în condiții naturale, favorizând transformarea compușilor organici din materia nevie în compuși mai simpli, accesibili pentru alte grupe de microorganisme, transformări ce permit un circuit natural al carbonului.

Majoritatea fermentațiilor descrise stau la baza biotehnologiilor alimentare când prin utilizarea culturilor starter se obțin produse cu mare valoare economică.

11. MICROBIOLOGIA ALIMENTELOR ȘI INCIDENȚA MICROORGANISMELOR CONTAMINANTE

Valoarea alimentară a unui produs este dată de valoarea nutritivă, senzorială și de gradul de inocuitate, respectiv absența din alimente a microorganismelor patogene, a substanțelor toxice microbiene și a organismelor care produc infestarea (ouă, larve, insecte).

Conținutul în microorganisme patogene a unui aliment variază în limite largi și acestea provin din materia primă supusă prelucrării la care se adaugă microorganisme provenite de la contactul cu utilajele, ambalajele, astfel încât produsul finit formează o anumită microfloră specifică produsului, dar în condițiile păstrării normale și respectării tehnologiei nu influențează calitățile produsului până în momentul consumării sale. Distrugerea culturilor de microorganisme selecționate care se introduc pentru a asigura calitățile produsului, duce la apariția unei microflore de contaminare care determină o poluare a produsului finit.

Studiul microbiotei alimentelor a condus la stabilirea în diferite țări a unei legislații privind gradul de contaminare cu microorganisme a alimentelor, formarea microbiotei în condițiile proceselor tehnologice de prelucrare a alimentelor, rolul microorganismelor la creșterea valorii biologice și alimentare, rolul etiologic al unor alimente în transmiterea microorganismelor patogene.

11.1. CONSIDERAȚII GENERALE ASUPRA MICROBIOTEI ALIMENTELOR

Microbiota alimentelor în funcție de natura microorganismelor componente, poate fi diferențiată în microbiotă specifică și nespecifică.

11.1.1. Microbiota specifică

Este alcătuită din microorganisme cultivate denumite și culturi starter introduse dirijat în produs, în scopul obținerii unor transformări dorite. În aceeași categorie intră și microbiota care se formează în etape tehnologice determinante și care realizează însușiri senzoriale și de compoziții obligatorii, cu o influență pozitivă asupra calității alimentelor. Microorganismele benefice introduse în mod dirijat sub formă de culturi pure pentru creșterea calității produselor alimentare nu sunt

considerate contaminanți deși, în funcție de condițiile de activitate și durata în care ele sunt active, acestea pot să producă uneori defecte senzoriale.

Microorganismele necesare în fermentația alimentelor pot fi adăugate sub formă de monoculturi/culturi mixte, sau în anumite cazuri nu se adaugă culturi, dacă microorganismele dorite, se cunoaște că sunt prezente în număr mare în materia primă. De exemplu, la murarea verzei, a murăturilor, a măslinelor, la fermentarea boabelor de cafea, cacao, materia primă conține o cantitate suficientă de microorganismele dorite, care vor acționa într-o succesiune proprie, dacă vor fi păstrate condițiile adecvate pentru fermentare. În aceste condiții nu este necesară sau avantajoasă adăugarea de culturi pure. În schimb folosirea culturilor starter pentru desfășurarea unei fermentații controlate se practică în multe biotehnologii alimentare la fabricarea produselor lactate acide, a brânzeturilor, untului, pâinii, berii, spiritului și băuturilor alcoolice, oțetului ș.a. (Larpernt, J., 2000).

11.1.2. Microbiota nespecifică Particularități ale microorganismelor contaminante

Microbiota nespecifică poate fi reprezentată de microorganismele organotrofe (saprofite) și microorganismele patogene.

Microorganismele organotrofe (saprofite)

Sunt foarte răspândite în natură și produc alterări ale alimentelor când se află în număr mare, ca rezultat al acțiunii lor asupra compușilor organici din aliment. Microorganismele care produc alterarea produselor alimentare au mai ales activitate proteolitică și lipolitică. Contaminarea produselor alimentare și înmulțirea microorganismelor în produse este nedorită deoarece ele scad valoarea nutritivă și biologică încât în unele cazuri fac imposibilă folosirea produsului în nutriție. Alături de modificarea însușirilor senzoriale, aceste microorganismele pot produce compuși toxici.

Microorganismele saprofite prezente în produse pot condiționa într-o serie de cazuri dezvoltarea unor procese biochimice obligatorii și deci să condiționeze calitatea alimentelor. În acest caz, ele devin specifice pentru microbiota dată a produsului, de exemplu – bacteriile lactice. Având însușiri antagoniste în raport cu alte microorganismele, acestea, adesea, asigură conservarea produselor alimentare și consumul este lipsit de pericol epidemiologic.

Alterarea microbiană

Microorganismele de alterare sunt întotdeauna prezente pe alimente neprocesate și includ bacterii, drojdii și mușegaiuri care dau modificări nedorite ale calităților senzoriale și nutritive ale alimentului (modificări de aromă, miros, gust, culoare, textură, consistență).

Alimentele perisabile sunt în primul rând cele cu compoziție chimică complexă și un conținut ridicat de apă, ca de exemplu: carnea, peștele, produsele lactate, vegetale, fructe. Dintre acestea produsele de origine animală au un pH apropiat de neutru, conțin cantități mari de proteine și lipide și sunt conservate la temperaturi scăzute. Aceste condiții favorizează creșterea bacteriilor Gram negative cu specii ale genului *Pseudomonas*, *Acinetobacter* (*Moraxella*) care prin activitatea lor proteolitică și lipolitică dau produși de alterare cu miros și gust putrid.

Din grupul alimentelor stabile în condiții normale de păstrare fac parte alimentele conservate și ambalate aseptice. În urma tratamentului termic se obține o sterilizare comercială termen care semnifică distrugerea tuturor microorganismelor capabile de creștere în aliment. În cazul în care rămân supraviețuitori aceștia în

general nu prezintă un pericol. În alimentele cu aciditate redusă se aplică o formulă de sterilizare care să asigure reducerea numărului de spori de *Clostridium botulinum* cu un factor de 10^{-12} . Pentru alte alimente: cereale, orez, nuci/alune, a_w , compoziția și structura anatomică sunt importante pentru conservabilitatea produselor. În general creșterea microbiană nu poate avea loc la a_w mai mic sau egal cu 0,6, cu o stabilitate de 1 an la valori de 0,7 și egală cu 6 luni la valori mai mari de 0,75, încât la valori peste 0,78 este probabilă alterarea rapidă.

Alterarea microbiană a alimentelor este un proces competitiv între bacterii, drojdii și mucegaiuri printre care, drojdiile joacă un rol neînsemnat deoarece ele constituie un procent redus din populația inițială

Microorganismele agenți ai intoxicațiilor alimentare

Îmbolnăvirea este cauzată prin consum de alimente în/pe care s-au dezvoltat microorganisme care elaborează metaboliți cu efect toxic. Perioada de incubație și simptomele evidențiate prin investigații pot fi corelate cu alimentul ingerat (în special pentru bacterii).

Mucegaiurile toxicogene. Produc intoxicații denumite micotoxicoze cu o perioadă de incubare prelungită încât este dificilă asocierea îmbolnăvirii, cu alimentul incriminat. Mucegaiurile pot forma colonii la suprafața produsului și în etapa de creștere colonială, o dată cu apariția sporilor, pot să sintetizeze produși secundari de metabolism de natură hidrocarbonată cu o toxicitate deosebit de ridicată. Omul și animalele pot să sufere intoxicații prin consum de alimente mucegăite, intoxicații care se manifestă prin îmbolnăviri ale diferitelor organe (ficat, rinichi etc.). Dintre bolile produse prin consum involuntar de micotoxine fac parte: ergotismul, aleucie toxică alimentară (ATA), hepatocarcinogeneza, nefrotoxicoze, sindromul hemoragic, poliurie ș.a. Produc micotoxine specii aparținând următoarelor genuri:

- Genul *Aspergillus* – reprezentanții genului produc aflatoxine denumite astfel de la specia *Aspergillus flavus*. Se cunosc 12 aflatoxine dintre care cele mai toxice sunt: B₁, B₂, G₁, G₂. Inițialele provin de la fluorescența pe care o dau aceste toxine prin expunerea plăcii cromatografice la radiații UV cu $\lambda = 360$ nm (blue = albastru, green = verde), în timp ce numerele se referă la ordinea de migrare pe cromatogramă. Aflatoxinele M₁, M₂ cu toxicitate mai redusă, pot fi detectate în laptele provenit de la animalele hrănite cu furaje (mucegăite cu specii toxicogene). Mai produc aflatoxine unele tulpini ale speciilor *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus wentii*. Aflatoxinele au efect toxicogen asupra animalelor și produc ciroze în 3 săptămâni de la ingerarea acestora cu 1 mg/kg corp. Încălzirea la 120°C, timp de 4 h, nu distruge în totalitate aceste micotoxine. Aflatoxinele nu sunt solubile în apă, ci în solvenți organici, dar aceștia nu pot fi folosiți pentru îndepărtarea micotoxinelor deoarece prin extracție se pierde valoarea alimentară a produsului.

- Genul *Penicillium* – specii ale genului pot produce peste 60 de toxine mai ales când se dezvoltă pe cereale și furaje. Dintre speciile producătoare fac parte: *P.islandicum* care se dezvoltă pe orez și produce 2 micotoxine: islanditoxina și luteoskirina. Pe fructe, se dezvoltă *P.expansum* care produce putrezirea albastră și sticloasă a merelor și sintetizează patulina. Se poate dezvolta pe cereale și produse de panificație. Patulina este rezistentă la temperaturi ridicate, la pH acid și are efect cancerigen. Dacă sucul de fructe este supus fermentației, o parte din toxină se elimină din lichidul fermentat. Alte specii: *P.citrinum* produce citrinina pe orez decorticat, cauzând afecțiuni renale; *P. citreoviridae* – citreoviridina, toxină ce

produce la om dereglări nervoase, simptome cardiace similare cu cele întâlnite în boala beri-beri etc.

- Genul *Fusarium* produce trichothecene care pot fi sintetizate și la temperaturi scăzute, deosebit de rezistente în timp (mucegaiurile pot să moară dar toxina rezistă ani de zile). Specii toxicogene: *F. sporotrichoides* produce sporofusariogenina producătoare de ATA ce se manifestă prin apariția pe piele a unor pete specifice, anghină pectorală, diateze hemoragice, afecțiuni ale măduvii, dând simptome similare cu cele produse prin iradiere cu radiații ionizante sau otrăvirea cu benzen. *F.nivali* se dezvoltă în special pe cereale și produce trei tipuri de toxine: fusarenona, fusarenona X și nivalenolul, toxine care determină în organismul animal o proliferare anarhică a celulelor, hematopoeză și simptome similare ATA (aleukie toxică alimentară).

- Genul *Rhizopus* – specii ale genului produc micotoxine ce dau stări de oboseală și poliurie.

- Genul *Cladosporium* – poate produce la temperaturi scăzute toxine de tipul acizilor tricarboxilici nesaturați care dau simptome caracteristice ATA.

Pe nutrețuri, cereale, porumb și furaje se mai pot întâlni mucegaiuri toxicogene ca *Ustilago*, *Stachybotris*, *Walemia*, *Dendrodochium toxicum* ș.a. Consumul de furaje contaminate cu mucegaiuri toxicogene poate cauza moartea animalelor (cazuri mai frecvent întâlnite la oi și cai), iar dacă animalul nu a ingerat doza letală, micotoxinele se acumulează în diverse țesuturi/organe, sau se pot elimina prin lapte, iar în cazul păsărilor, prin ouă.

Bacterii toxicogene

Dintre agenții bacterieni ai intoxicațiilor prin alimente contaminate fac parte următoarele specii:

Clostridium botulinum este un saprofit care crește rar în organisme vii, capabil de a produce toxine prin creșterea în alimente. Produce 8 toxine de natură proteică diferențiate din punct de vedere imunologic. Tulpinile producătoare de neurotoxine A, B, E, dau botulismul la om și produc sindrom neuroparalitic cu efect letal. Manifestarea stării de boală are loc după 1-10 zile și cazurile letale ajung până la 68%. După ingerarea toxinei botulinice după 8-36 ore apar stări de vomă, dureri abdominale și diaree, apoi starea de uscăciune în gură, dilatarea pupilelor, viziune dublată, dificultăți respiratorii, căderea mușchilor faciali, iar moartea este datorată asfixierii, stopului cardiac, infecțiilor pulmonare. Toxinele botulinice au o toxicitate ridicată (o doză de 0,2 μg poate omorî un om de 100 kg).

Prin dezvoltarea lui *Clostridium botulinum*, carnea și alte alimente bogate în proteine, vegetalele cu aciditate scăzută, capătă un miros alterat sau se formează gaze prin procese de fermentație, aspect care însă nu poate fi sesizat în alimente cu aciditate mai ridicată sau cu un conținut redus în proteine. Producerea toxinelor este oprită în alimente cu pH<4,5, iar în condiții optime de cultură este inhibat la concentrații de 8-10% NaCl.

Staphylococcus aureus este agentul specific responsabil pentru enterointoxicații. Produce intoxicații alimentare prin elaborarea de enterotoxine foarte termostabile, cu rată redusă de letalitate și cu o perioadă scurtă de incubare chiar după 30 minute de la ingerare, în general după 3-6 ore. Se transmite de la indivizii purtători de tulpini enterotoxice la care rezidă ca saprofit în fosa nazală și se elimină prin secreții nazale și expectorație, fiind ejectat în picături, prin tuse și strănut. Se mai transmite în timpul fumatului când degetele ating buzele sau nasul, în timpul

mâncatului, prin intermediul tacâmurilor. Este rezident de tranzit al pielii și părului și permanent în tractul intestinal, încât contaminarea este categoric datorată unei manipulări și procesări neigienice a alimentelor.

Intoxicațiile stafilococice sunt asociate cu consumul unor alimente gata preparate păstrate la temperatura camerei: creme, frișcă, produse de patiserie, plăcintă de carne, ouă, șuncă, lapte de la animale bolnave. Cu excepția laptelui și a brânzeturilor care pot fi contaminate de la animale bolnave de mastită, celelalte sunt contaminate prin intermediul omului. Riscul de intoxicație crește deoarece prin dezvoltarea acestor bacterii, nu apar în mod obligatoriu modificări de gust și miros ale alimentului, chiar când numărul lor este de sute de milioane per gram.

Microorganisme patogene transmisibile prin alimente

Dintre agenții toxiinfecțiilor alimentare, fac parte bacterii aparținând următoarelor genuri/specii:

- *Salmonella* cuprinde specii ce sunt agenți importanți ai toxiinfecțiilor alimentare: *Salmonella enteridis*, *S.dublin*, *S.typhimurium* ș.a. Aproape toate alimentele pot fi contaminate în condiții neigienice de manipulare. Aceste bacterii se pot înmulți pe alimente, dar nu produc modificări senzoriale; sunt frecvent întâlnite în ouă proaspete, congelate sau sub formă de pulbere, în lapte praf, pe carnea de pui, cârnați, homari, scoici etc. Peste 40% din puii tăiați și comercializați pot fi contaminați cu bacterii. De la aceștia, indirect se pot contamina alte alimente în timpul păstrării sau preparării, încât este o cale majoră pentru *Salmonella* de a pătrunde în hrană. Toxinele sunt intracelulare, deci se formează și rămân în celula bacteriei. În cazul fierberii ouălelor dacă gălbenușul a rămas fluid salmonelele pot supraviețui. Controlul infecțiilor cu salmonele este dificil deoarece ele pot crește la temperaturi scăzute de 6°C, mor lent în timpul păstrării alimentelor prin congelare, dar rezistă în produse uscate și pot fi eliminate din alimente numai prin tratament termic adecvat.

Shigella (*Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*) sunt bacterii patogene de origine intestinală transmisibile prin apă, care nu cresc în alimente. Contaminarea accidentală a alimentelor (cu excreții ale indivizilor bolnavi de dizenterie) și ingestia unui număr de minimum 10^8 celule aparținând lui *Sh.dysenteriae*, după o incubare de 4-7 zile, ca urmare a producerii de exotoxine proteice cu activități citotoxice, neurotoxice și enterotoxice, au loc inflamații și ulceratii ale intestinului. Persoanele bolnave pot fi purtători ai bacteriilor patogene, timp de câteva săptămâni.

Listeria monocytogenes produce rar listerioze (letalitate în 20-50% din cazuri) cu o perioadă de incubație de câteva săptămâni. Recent s-a stabilit că aceste bacterii foarte răspândite în apă, sol, plante, pot fi vehiculate prin alimente. Detectarea bacteriilor în alimente este dificilă și cele mai rapide metode durează minimum 4 zile. Bacterii din genul *Listeria* au fost găsite în lapte nepasteurizat, pește afumat la rece, în unele brânzeturi, în particular în Brie și Camembert. Pe vegetale pot crește după ce acestea au fost tăiate, în contact cu sucul celular. Se apreciază că 25% din cele aproximativ 1600 de cazuri depistate anual, pot avea efect letal.

Escherichia coli poate prezenta tulpini patogene, agenți ai enteritei infantile, enteropatogene, care se pot dezvolta pe epiteliul intestinal, verocytotoxice, produc colite hemoragice. Enterotoxinele produse de *E.coli* sunt endotoxine legate ferm de peretele celular, pot fi proteine termolabile care se inactivează la 60°C în 30 de minute și se distrug complet la pH = 3,5-5, rezistente la acțiunea tripsinei. Majoritatea tulpinilor normal întâlnite în microbiota intestinală aparținând lui *E.coli* sunt lipsite de

risc și pot fi folosite ca indicatori igienico-sanitari în controlul microbiologic al alimentelor. Pot contamina alimentele prin intermediul apei poluate cu materii fecale și supraviețuiesc, indiferent dacă alimentul e conservat prin frig.

Vibrio cholerae poate produce holera și o diaree explozivă, cu efect letal în peste 40% cazuri dacă nu se aplică un tratament adecvat. Poate crește pe diferite alimente și se consideră că holera demarează ca o toxiinfecție alimentară.

Streptococcus (Enterococcus): S.faecalis, S.bovis, S.durans, provoacă posibile stări de toxiinfecție când concentrația bacteriilor în produs este de 10^6 - 10^7 /g.

Bacillus cereus și în ultimii ani, *Bacillus licheniformis* și *Bacillus subtilis* pot fi implicate în producerea de îmbolnăviri cu etiologie mixtă (intoxicație și infecție). Aceste bacterii pot produce sindrom emetic (grețuri, stări de vomă) observat după 1-5 ore după consum, frecvent prin consum de orez fiert/prăjit sau sindrom manifestat prin stări diareice după 8-16 ore, ca urmare a consumului de alimente reîncălzite, preparate cu boia de ardei sau alte condimente ce pot conține un număr mare de spori. *B.cereus* poate crește la temperaturi scăzute de 10°C, dar se consideră că toxinele pot fi elaborate la temperaturi peste 15°C.

Clostridium perfringens se elimină prin materiile de dejecție ale omului și animalelor și prin nerespectarea condițiilor de igienă pot contamina alimentele, dar se poate transmite și prin sol, praf, ape, condimente etc. Creșterea lui pe produse (alimente cu carne gata preparate, insuficient tratate termic) este asociată cu formare de acid butiric și gaze. Din cele 8 tipuri de toxine tipul A și C sunt implicate în intoxicații alimentare și infecție. Este cunoscut prin capacitatea sa de a supraviețui în mâncăruri gătită care nu au fost păstrate la rece în mod corespunzător, deoarece majoritatea tulpinilor nu cresc sub 15°C și un număr redus de izolate au crescut la 6°C. După ingestia alimentului contaminat are loc multiplicarea bacteriilor în intestinul subțire, producerea de enterotoxine și eliberarea de toxine prin liza celulelor.

În calitate de agenți ai toxiinfecțiilor alimentare sunt vizate și genuri mai puțin studiate ca: *Enterobacter, Citrobacter, Hafnia, Klebsiela*, și altele, cărora în ultimii ani li se acordă o mare importanță. Mai sunt denumite și bacterii nonfecale fiind prezente pe produse vegetale, în ape, fiind constituenți normali ai microbiotei aerului, pe suprafețe, ambalaje, mâini, de pe care pot fi transferate la manipularea alimentelor.

Microorganismele patogene transmisibile prin alimente dau anual zeci de milioane de cazuri de îmbolnăviri intestinale. Pentru oamenii sănătoși disconfortul produs de diversele simptome (starea de vomă, crampe abdominale și diaree) poate fi de scurtă durată, în schimb la oamenii cu imunitate slabă (cum ar fi cei bolnavi de SIDA) simptomele sunt mai severe, infecția este greu de tratat și poate avea efect letal.

Trebuie subliniat că, termenul general pentru îmbolnăviri ale omului, cauzate prin ingerarea de alimente contaminate, întâlnit în literatura de specialitate prin traducere din limba engleză (Food poisoning) este cel de **toxiinfecție alimentară** sau **intoxicație alimentară**.

Pentru acuratețea exprimării se recomandă folosirea termenului de **contaminare** atunci când microorganismele ajung din diferite surse, de exemplu: pe produse alimentare procesate. Termenul de **infestare** exprimă în mod corect contaminarea cu: insecte, larve, ouă, nematozi etc.

12. MICROBIOLOGIA LAPTELUI ȘI A PRODUSELOR DERIVATE

12.1. MICROBIOTA LAPTELUI

Laptele este un produs foarte valoros din punct de vedere nutritiv deoarece conține în cantități corespunzătoare surse de C, N, substanțe minerale și factori de creștere. Laptele are un pH de 6,5 (laptele de vacă) și rH = 12-18, (domeniu favorabil activității microorganismelor facultativ anaerobe). Dacă laptele se păstrează, la suprafața lui se acumulează un strat de grăsime astfel încât accesul aerului este oprit, are loc reducerea potențialului redox și se pot dezvolta astfel bacteriile anaerobe.

Datorită compoziției sale, laptele este un mediu excelent pentru dezvoltarea numeroaselor microorganisme, dar bacteriile lactice au condiții favorizante.

12.1.1. Contaminarea internă a laptelui

Are loc în timpul colectării laptelui, ca urmare a pătrunderii în lapte a unor microorganisme patogene, sau a unor substanțe transmisibile de la animalul bolnav.

Microorganisme patogene

Genul *Mycobacterium* conține 50 de specii dintre care obligat patogene: *M. tuberculosis tip uman*, agentul tuberculozei, *M.bovis (Mycobacterium tuberculosis tip bovis)*, *M.leprae* ș.a. De la animalele bolnave de tuberculoză se poate transmite prin lapte *Mycobacterium bovis*, bacterie descoperită în 1882 de către Robert Koch. Nu se înmulțește în lapte, dar poate supraviețui chiar zile și săptămâni. Deși se pare că tipul bovis nu ar provoca îmbolnăviri ale omului, au existat situații în care indivizii cu imunitate scăzută s-au îmbolnăvit prin consum de lapte contaminat. Îmbolnăvirea constă în apariția de leziuni ale faringelui și mărirea nodulilor limfatici. Deci *Mycobacterium tuberculosis tip uman* se răspândește de la om la om și dă tuberculoza pulmonară, în timp ce *tipul bovis* se transmite frecvent prin lapte nepasteurizat și produce tuberculoze nepulmonare.

Pentru evitarea oricărui risc, laptele contaminat este preluat de întreprindere pe linii separate și în mod obligatoriu se face o pasteurizare corespunzătoare pentru a distruge aceste bacterii patogene, care au o termorezistență superioară altor patogeni transmisibili prin lapte.

Genul *Brucella* cu speciile *B.abortus*, *B.melitens*, se pot transmite prin lapte de vacă, ovine, caprine sau prin inhalarea aerosolilor cu bacterii și pot produce îmbolnăviri prin infecție, manifestată prin avort spontan și septicemie. Bacteriile din genul *Brucella* sunt inactivate rapid la temperaturi de peste 60-65°C, în schimb în laptele crud pot rezista mult timp. *Brucella abortus* transmisibil prin lapte de la animale bolnave supraviețuiește în lapte păstrat la 0°C timp de 40 zile.

Streptococii patogeni: *Streptococcus pyogenes* produce inflamații ale țesuturilor, este distrus la pasteurizare, dar poate pătrunde în laptele pasteurizat de la indivizii bolnavi. Streptococii responsabili pentru mastita la vaci (inflamarea ugerului) sunt: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*.

Staphylococcus aureus se înmulțește în lapte dacă nu se produce o răcire corespunzătoare a acestuia și poate produce enterotoxine.

Genul *Salmonella* – prin lapte contaminat se pot transmite *S.typhi*, *S.dublin*, *S.heidelberg* și *S.newport* care au fost izolate din lapte colectat de la vite cu febră și enterită, fără mastită. Se pot înmulți în lapte proaspăt, dar odată cu acumularea de acid lactic și scăderea pH-ului la 5-4,3 înmulțirea este oprită, în schimb acestea pot supraviețui 2-9 săptămâni.

Dintre bacteriile patogene pentru om prin lapte se mai pot transmite *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Pasteurella*. Prin lapte se mai pot transmite și virusuri, agenți ai bolilor virale: poliomielita, hepatită ș.a., iar virusul agent al febrei aftoase la vite rezistă în lapte păstrat la 5°C timp de 12 zile.

Microorganismele nepatogene

Bacteriile lactice: genul *Lactococcus* – prezența lor este constant normală în lapte; bacterii ale genului *Lactobacillus* sunt mai rar întâlnite. Numărul microorganismelor ce ajung în lapte din surse interne poate varia între 1000-1500 celule/cm³, microorganismele prezente, indiferent de condițiile igienico-sanitare aplicate.

Alte substanțe transmisibile prin lapte

Prin contaminarea internă mai pot ajunge accidental în lapte antibiotice atunci când animalele au fost sub tratament, care influențează negativ activitatea bacteriilor lactice, sensibile la antibiotice. Când animalele au fost furajate cu produse mucegăite și au ingerat eventual micotoxine, acestea pot fi transformate în organismul animal și eliminate în lapte, de exemplu sub formă de aflatoxine: M₁, M₂ cu efect toxic mai scăzut decât al celor de tip B₁, B₂.

12.1.2. Contaminarea externă a laptelui

Este datorată microorganismelor din surse contaminante ale mediului ambiant și are loc în timpul mulgerii, la transport/păstrare de la punctul de colectare la fabrică până în momentul prelucrării laptelui, prin contact cu vasele, aparatele de colectare și transport, aer.

Principalele surse de contaminare cu microorganismele (inofensive, periculoase pentru sănătate sau care dau alterarea calității) sunt:

- **fecale și tegumente**, surse de coliformi, bacterii patogene de origine intestinală. Prin intermediul materiilor fecale de la om la animale bolnave se pot transmite următoarele microorganismele patogene: *Bacillus anthracis* (produce antraxul), *Bacillus cereus* – agent al gastroenteritelor; *Salmonella sp.* – agenți ai toxiinfecțiilor alimentare; *Shigella* – agenți ai dizenteriei; specii patogene ale genurilor: *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*. O sursă importantă o prezintă părul și pielea (10⁸ - 4•10⁹ celule/g păr). Contaminarea poate avea loc frecvent prin intermediul apei, a bălegarului (8•10⁶ - 18•10⁹ celule/g). Ușorul spălat și zvântat reduce contaminarea externă a laptelui;
- **sol** – poate fi o sursă de contaminare cu bacterii *Streptomyces*, *Clostridium*, *Bacillus*, spori de mucegai;
- **aer și apă**, cu microorganismele diverse. Contaminarea prin intermediul aerului din grajd (10⁶/dm³) e mai abundentă dacă s-a făcut furajarea, datorată prafului, motiv pentru care mulgerea se face înainte de hrănirea animalelor;
- echipamentele de la colectare și păstrare pot fi o sursă importantă de contaminare a laptelui cu bacterii lactice, micrococi, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, drojdii. Contaminarea poate avea loc și prin intermediul vaselor de colectare, deoarece laptele formează pe suprafața vaselor o peliculă, iar dacă în recipient se face încălzirea, pe suprafața pereților se formează piatra de lapte, un amestec de fosfați și săruri minerale deosebit de rezistentă, care face dificilă îndepărtarea microorganismelor aderente;
- **personal**, purtător de stafilococi eliminați prin expectorație și prin materii fecale, în condiții neigienice;

- **vectori diverși**, de ex., insecte (o muscă poate introduce în lapte aprox. 10^6 microorganisme).

Contaminarea externă este ocazional dată de numeroase alte grupe de microorganisme care prin activitatea lor poate fi în marea lor majoritate, agenți de alterare.

12.1.3. Calitatea microbiologică a laptelui

Este dependentă de contaminarea inițială, de cea care continuă la transport și în vasele de colectare, de temperatură și durata de păstrare.

Pentru a preveni înmulțirea în exces a microorganismelor se recomandă răcirea rapidă a laptelui de la 37°C la 5°C . Dacă laptele este păstrat la temperaturi scăzute, în lapte se vor dezvolta predominant bacteriile psihrotrofe care pot produce enzime termostabile ce pot rămâne active după pasteurizare și pot da defecte în produsele finite. Dacă laptele nu este răcit în câteva ore de la colectare, numărul de microorganisme ajunge la valori de ordinul 10^6 când răcirea va avea o eficiență redusă.

12.1.4. Microbiologia laptelui pasteurizat

Prin pasteurizarea laptelui se urmărește distrugerea eventualelor bacterii patogene transmisibile prin lapte, ca și reducerea numărului de bacterii care dau alterări ale laptelui.

Pentru a asigura calitatea sanitară a laptelui în industria laptelui se folosesc următoarele regimuri de tratare termică:

- **pasteurizare joasă la 63°C** timp de 30 minute (low temperature, long time);
- **pasteurizare la 75°C** timp de 15-20 secunde în sistem HTST (high temperature, short time). Acest regim este stabilit ținând cont ca *Mycobacterium tuberculosis tip bovis* este distrus la $61,6^{\circ}\text{C}/28,5$ minute și la $71,6^{\circ}\text{C}$ în 14 secunde, la care este prevăzută în plus, o limită de siguranță. Laptele pasteurizat nu conține microorganisme patogene deoarece prin respectarea regimurilor de T/t sunt inactivate toate bacteriile patogene ocazional transmisibile prin lapte,
- **sterilizare la $132-138^{\circ}\text{C}$** timp de 1-2 secunde, în sistem UHT (ultra high temperature).

12.1.5. Defecte de natură microbiană ale laptelui crud și pasteurizat

În timpul păstrării laptelui crud sau laptelui pasteurizat apar anumite defecte datorate activității microorganismelor care au ajuns în lapte și nu au fost inactivate prin pasteurizare.

Dintre defecte ocazional pot fi întâlnite:

- **acidifierea și coagularea** – prin acumularea de acid lactic, proteinele din lapte pot să precipite și are loc coagularea acidă a laptelui la $\text{pH} = 4,6$ și separarea de zer. Laptele este acru când numărul de bacterii lactice aparținând genului *Lactococcus* cu specia *Lactococcus lactis* este de $10 \cdot 10^6 - 40 \cdot 10^6 / \text{cm}^3$. Alterarea laptelui pasteurizat este cauzată de streptococii rezistenți la tratamentul termic aplicat care produc acid lactic până pH -ul scade la 4,6 și are loc coagularea acidă. Dacă sunt prezenți și lactobacili, pH -ul scade la 4. Laptele pasteurizat, prin păstrare la temperaturi de refrigerare poate suferi o coagulare neacidă datorată activității lui *Pseudomonas fragi*;

- **coagularea acidă** asociată cu formarea de gaze cu formarea unui coagul buretos poate fi datorată fermentației lactozei de către *Enterobacter aerogenes* și *Clostridium perfringens*;
- **coagularea neacidă** este datorată proteazelor produse de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* și uneori prin dezvoltarea micrococilor și a lui *Enterococcus faecalis*;
- **proteoliză și lipoliză** – sunt procese enzimatice ce au loc prin menținerea laptelui la temperaturi scăzute și sunt produse de bacterii coliforme, bacterii ale genului *Pseudomonas* și de către alte bacterii lipolitice din genurile: *Bacillus*, *Acinetobacter* și *Achromobacter*;
- **colorarea** – apare la laptele crud în timpul verii în urma dezvoltării unor microorganisme producătoare de pigmenți astfel: *Chromobacterium cyanogenum* și *Pseudomonas syncyanca* produc pigmenți albaștri; *Brevibacterium prodigiosus* și *Brevibacterium erythropeus* dau pigmenți roșii;
- **gustul amar** poate fi întâlnit în laptele proaspăt atunci când încărcătura microbiană este foarte mare înainte de pasteurizare și este dat de bacterii peptonizante din genurile: *Microbacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*. Produc peptide amare prin hidroliza proteinelor laptelui. Gustul amar poate proveni și prin activitatea de oxidare ya lactozei la acid lactobionic (genul *Pseudomonas*);
- **alcalinizarea laptelui** datorată eliberării de amoniac prin activitatea lui *Pseudomonas fluorescens*, *Alcaligenes faecalis*;
- **gustul de caramel** la dezvoltarea în lapte a lui *Lactococcus maltigenes*;
- **defecte de consistență** – coagularea cazeinei sub acțiunea bacteriilor lactice sau mărirea vâscozității laptelui datorată dezvoltării unor microorganisme ce produc substanțe de natură poliglucidică dând lapte filant, ca de exemplu: *Alcaligenes viscolactis*, *g. Micrococcus*, *g. Enterobacter*.

12.1.6. Microbiologia laptelui praf

La obținerea laptelui praf se folosește un lapte degresat de calitate microbiologică foarte bună. Prin operația de centrifugare, în smântână, se elimină aproximativ 60% din microbiota bacteriană a laptelui. Urmează apoi pasteurizarea pentru inactivarea enzimelor și reducerea numărului de bacterii, concentrarea și uscarea prin pulverizare. Temperatura de uscare este astfel dirijată încât să atingă 72°C pentru a inactiva eventualele bacterii patogene.

Laptele praf are o umiditate de 3-3,5% care nu permite înmulțirea microorganismelor. Bacteriile se află în stare de xeroanabioză și nu influențează calitatea dacă umiditatea este mai mică de 3,5%.

Ocazional în microbiota laptelui praf pot fi întâlnite bacterii sporogene *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, micrococi, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus bovis* și alte bacterii termorezistente. Laptele praf este un produs higroscopic încât dacă după deschiderea ambalajului umiditatea crește >11% se produce mucegăirea, râncezirea și modificarea gustului. Din punct de vedere microbiologic se admit $5 \cdot 10^4$ - $7 \cdot 10^4$ /g (până la 2000 de microorganisme per cm^3 lapte reconstituit 1/10), iar *Escherichia coli* să fie absent la 1 g.

12.2. MICROBIOLOGIA PRODUSELOR LACTATE ACIDE

Produsele lactate acide se obțin într-o gamă variată ca urmare a inoculării cu culturi specifice, deși folosesc aceeași materie primă (laptele pasteurizat). Produsele lactate acide au valoare nutritivă și valoare biologică ridicată, deoarece prin consumul de bacterii lactice (ocazional drojdii), omul beneficiază de prezența unor

vitamine produse de aceste microorganisme. Bacteriile lactice pot produce substanțe cu efect antibiotic ca: bulgaricina, acidofilina, care pot grăbi vindecarea bolilor gastrointestinale. Unele bacterii lactice se pot adapta în organismul uman, deoarece au temperatura optimă de 37°C cum ar fi cele izolate din microbiota intestinală a sugarilor (*Lactobacillus acidophilus* și *Lactobacillus bifidus*).

Tehnologiile de preparare a acestor produse au la bază utilizarea de culturi de bacterii lactice selecționate ce se folosesc sub formă de monoculturi sau culturi mixte cu proprietăți biotehnologice corespunzătoare pentru obținerea unor produse de calitate constantă.

La obținerea produselor lactate acide, în prima etapă se realizează în laboratorul uzinal activarea culturilor pure pentru obținerea cantității de inocul necesar în declanșarea fermentației lactice.

Inoculul de producție (maia) trebuie preparat în cantități suficiente, încât prin inocularea laptelui pasteurizat să existe un număr de celule de bacterii lactice care să depășească de cel puțin 1000 de ori pe cel al microorganismelor existente în microbiota reziduală a laptelui pasteurizat.

Pentru activarea culturii pure de bacterii lactice, în fabrică se execută 2-4 pasaje sau inoculări succesive, inoculări care se fac la intervale în care se asigură timpul și temperatura optimă pentru creșterea și activitatea celulelor inoculate

Pasajul de la volume mici la volume mari pentru obținerea inocului de producție se realizează după ce a avut loc coagularea laptelui, care corespunde cu sfârșitul fazei exponențiale de creștere bacteriană. Între etape se face controlul microbiologic al culturii și se determină aciditatea, iar prin examen microscopic se determină puritatea și concentrația de celule, prin metoda Breed.

12.2.1. Microbiologia iaurtului

Iaurtul (yogurt) denumește corect, produsul obținut prin fermentarea laptelui cu o cultură mixtă din 2 specii de bacterii lactice termofile, *Streptococcus thermophilus* (SST) și *Lactobacillus bulgaricus* (LDB), care trebuie să existe în stare vie în produsul final (aprox. 10^6 ufc/g iaurt).

Rolul culturii starter la fabricarea iaurtului. În culturile starter pentru iaurt raportul între *Lactobacillus bulgaricus* și *Streptococcus thermophilus* este de 1:1. În cultura mixtă între bacteriile lactice se stabilesc relații de cooperare, fiecare monocultură produce substanțe care nu sunt inițial prezente în lapte și care influențează pozitiv creșterea celeilalte. Producerea de acid lactic de către LDB este stimulată la concentrații scăzute ale acidului formic produs de SST în absența oxigenului cât și de CO₂ eliberat prin fermentație. Streptococii cresc mai repede și sunt responsabili pentru aciditate în timp ce lactobacilii adaugă aromă în special datorită formării aldehidei acetice. Prin activitatea lor, lactobacilii care au activitate peptidazică produc compuși cu azot, asimilabili pentru streptococi ceea ce explică relația de sinergism între streptococi și lactobacili la fabricarea iaurtului.

Rolul streptococilor și lactobacililor la obținerea iaurtului constă în acidifierea laptelui, sinteza de aromă, dezvoltarea texturii și a vâscozității.

Interacțiunile între bacterii lactice din iaurt sunt deosebit de complexe și benefice pentru stimularea creșterii activităților fermentative. *S. thermophilus* nu posedă activitate proteolitică extracelulară suficientă, iar cantitatea de aminoacizi și peptide libere în lapte nu sunt suficiente pentru creșterea sa optimă. Lactobacilii produc proteaze care degradează cazeinele laptelui și asigură streptococilor sursele necesare de azot pentru creștere. Activitatea endopeptidazică a lactobacililor este

intracelulară și este optimă la 45-50°C și pH = 5,2+5,8 și sunt inactivate la 70°C timp de 1 minut. Proteinazele din *Lb. bulgaricus* sunt active față de β cazeină. Prin activitatea proteazică lactobacilii termofili contribuie la ameliorarea proprietăților reologice, a digestibilității și aromei.

În timpul fabricării iaurtului numărul maxim de bacterii lactice ajunge la valori de 10⁹/g, apoi numărul se reduce progresiv la păstrare la 10⁷/g. În iaurtul congelat bacteriile lactice au supraviețuit și după 60 săptămâni.

12.2.2. Produse fermentate cu bifidobacterii

Produsele fabricate din lapte cu culturi de bifidobacterii pot fi lichide, de tip iaurt sau sub formă de pulberi și conțin în mod obligatoriu concentrații de 10⁸-10⁹ celule vii/cm³.

Bio-iaurtul, produs recent introdus în consum, conține pe lângă bacteriile specifice iaurtului, bacteriile *Lactobacillus acidophilus* și *Bifidobacterium bifidum*. Produsul are efect benefic suplimentar deoarece ameliorează creșterea bacteriilor care în mod normal fac parte din microbiota intestinală. Echilibrul acestor bacterii este considerat a fi foarte important în menținerea sănătății intestinale și ar putea ajuta la protecție față de unele boli majore cum ar fi cancerul și bolile coronariene.

Bifidobacteriile au temperatura optimă de 36-38°C, nu sunt acidotolerante și nu se înmulțesc la temperaturi mai mici de 5,5°C. Folosirea de bifidobacterii poate conduce la obținerea de produse aromate dacă se adaugă proteine din zer bogate în treonină, ca precursor pentru acumularea de aldehydă acetică.

12.2.3. Microbiologia chefirului

Acest produs se obține utilizând un amestec de streptobacterii mezofile asociate cu drojdiile din genul *Torulopsis*, microorganisme care sunt fixate pe cazeina coagulată sub forma „granulelor de chefir”. Între aceste culturi apar relații de simbioză deoarece bacteriile lactice beneficiază de vitaminele din grupa B produse de drojdiile, iar drojdiile au activitate fermentativă optimă la valori acide de pH.

Pentru inocularea laptelui se folosesc granulele de chefir cu dimensiuni de 0,5-3,5 cm constituite din protide și poliglucide rezultate prin activitatea biomasei microbiene.

12.2.4. Microbiologia cumâsului

Cumâsul se obține din lapte de iapă mai bogat în lactoză (6,2%) și conține 2% alcool etilic rezultat prin fermentația lactozei. Drept culturi starter se folosesc *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, *Acetobacter aceti* și drojdiile din genul *Torulopsis* și *Kluyveromyces marxianus* care produc fermentația alcoolică și mici cantități de aldehydă acetică.

În cumâs și chefir activitatea lipazică a bacteriilor lactice este limitată, în schimb drojdiile dau cantități mari de acizi grași liberi: caproic, caprilic și lauric, ce contribuie la gustul specific.

12.2.5. Defecte de natură microbiană a produselor lactate acide

În cazul produselor lactate acide păstrate mai mult timp sau ca urmare a procesului tehnologic defectuos, acestea pot suferi diferite tipuri de alterări microbiene:

- **Brânza proaspătă de vaci** poate suferi defectul de acire, când se păstrează la temperaturi ridicate și gustul amar atunci când predomină bacteriile sporulate. Se

presupune că gustul amar rezultă din formarea peptidelor amare, care conțin acid pirolidon carboxilic ce poate rezulta din transformarea acidului glutamic.

- **Smântâna** poate suferi defectul de mucegăire de *Geotrichum*. În condițiile în care în grăsimi rămân bacterii lipolitice la păstrare se produce râncezirea hidrolitică cu eliberarea de acizi grași care prin oxidare generează aldehide, cetone. În smântâna trebuie să fie absente bacteriile patogene și se admit 20 bacterii coliforme/g smântâna.

12.3. MICROBIOLOGIA UNTULUI

La fabricarea untului se poate folosi smântâna dulce și mai frecvent smântâna fermentată. În acest scop smântâna dulce este pasteurizată și după răcire este inoculată cu culturi mixte de bacterii lactice aromatizante producătoare de acid lactic, diacetil și acetil metil carbinol.

Dintre acestea fac parte *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus diacetylactis* și *Leuconostoc mesenteroides*. Aceste bacterii pot produce substanțe de aromă din acidul piruvic format prin fermentația lactozei, sau din acidul citric prezent în lapte. În general după fermentare la 22°C, timp de 24 ore, smântâna maturată cu aproximativ 55°Thörner (pH 4,7), suferă operația de batere cu separarea în zară a unui număr mare de microorganisme. Urmează spălarea masei de unt cu apă pură din punct de vedere microbiologic, malaxarea și caluparea. Se recomandă ca apa potabilă se suferă în prealabil o clorinare cu 5-10 mg Cl₂/dm³, timp de 15 minute pentru o decontaminare suplimentară. Prin malaxare are loc dispersarea fină a apei, astfel încât untul poate conține aproximativ 10¹⁰ micropicături per gram, majoritatea cu diametrul < 5 μm reținând aproximativ 2% din microbiota apei.

Numărul de microorganisme în untul proaspăt din smântâna fermentată este de aproximativ 10⁷-10⁹/g. În absența oxigenului și a nutrienților are loc treptat o reducere a numărului de lactococi, încât după o lună de păstrare în microbiota untului predomină micrococi și drojdii, microorganisme ce pot proveni din apa de spălare sau antrenate de pe suprafața utilajelor.

În untul din smântâna dulce predomină microbiota remanentă atașată de globulele de grăsime separate la centrifugare la care se adaugă microorganisme de contaminare astfel încât numărul de celule poate fi de ordinul 10⁵-10⁶/g. În funcție de temperatura de păstrare, evoluția creșterii microorganismelor este diferențiată. Prin păstrare la temperaturi de 15°C are loc o creștere a numărului de bacterii lactice, care ajung la concentrații de 10⁷/g, în schimb la păstrarea la 5°C se dezvoltă mai intens bacteriile psihrofile, cu activitate lipolitică și proteolitică.

Defecte de natură microbiologică la păstrarea untului

La păstrarea untului, în funcție de natura microorganismelor de contaminare și numărul lor, se pot produce următoarele defecte:

- **Râncezirea** – microorganismele care sintetizează lipaze exogene pot produce hidroliza lipidelor din unt cu formare de acizi grași și care inițiază râncezirea hidrolitică. Dintre bacteriile producătoare de lipaze: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putrefaciens*, *g. Flavobacterium*, *g. Alcaligenes*, care pot contamina untul după pasteurizare, de pe echipamente sau din apa de spălare.

- **Gustul putrid** rezultă prin activitatea bacteriilor cu activitate proteazică și lipolitică ale genului *Pseudomonas* cu speciile *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas nigrificiens*. Este sesizat un miros specific datorat formării de acid izovalerianic și poate avea loc colorarea în negru la suprafața untului.

- **Mucegăirea untului** se poate produce superficial de către mucegaiuri producătoare de lipaze din *g. Aspergillus*, *g. Penicillium*, iar mucegăirea internă de către *Cladosporium herbarum*, mucegai microaerofil ce se dezvoltă în micropicături de lichid din masa de unt, formând puncte negre, inestetice. Din grupul fungilor mai pot fi întâlnite pe suprafața untului reprezentanți ai genurilor *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Torulopsis*.

Pentru aprecierea calității untului, standardele prevăd absența bacteriilor coliforme pe gram produs și admit, în funcție de calitatea untului, între 1000-2000 celule de drojdii și mucegaiuri/g.

12.4. MICROBIOLOGIA BRÂNZETURILOR

Brânzeturile se obțin într-o gamă variată de sortimente, peste 600, variante posibile prin modificarea componentelor principale din lapte sub acțiunea culturilor selecționate de microorganisme folosite drept culturi starter la prelucrarea laptelui.

Pentru obținerea brânzeturilor se poate utiliza laptele ca atare în care bacteriile lactice trebuie să reprezinte peste 50% din totalul microbiotei, cu restricții privind prezența bacteriilor butirice (absente la 1 cm³), a bacteriilor coliforme, a bacteriilor de putrefacție din genul *Pseudomonas*.

Pentru evitarea unor defecte și a riscului de transmitere a unor bacterii patogene de la animale bolnave, după colectarea laptelui și verificarea lui din punct de vedere calitativ și cantitativ se efectuează pasteurizarea în regim t/T care să nu producă denaturarea proteinelor laptelui și să asigure distrugerea microorganismelor patogene transmisibile prin lapte. După răcire se realizează inocularea laptelui cu monoculturi sau culturi mixte specifice, are loc înmulțirea bacteriilor concomitent cu fermentația lactică, iar etapele tehnologice urmăresc să dirijeze activitatea utilă a culturilor starter.

Brânzeturile nu reprezintă un substrat ideal pentru dezvoltarea tuturor microorganismelor, dar unele microorganisme, din care fac parte și microorganismele selecționate, utilizate drept culturi starter în industria brânzeturilor, sunt adaptate acestui tip de biotop.

După inocularea în laptele pasteurizat și răcit la temperatura optimă pentru culturi, bacteriile produc fermentarea lactozei cu formare de acid lactic și substanțe de aromă.

La sortimentele de brânzeturi cu pastă moale, fermentația lactică durează 4-6 ore până când, prin formarea de acid lactic pH-ul scade sub 4,5, când se produce coagularea acidă a caseinei din lapte.

La sortimentele de brânzeturi cu pastă tare, de exemplu, când pH-ul ajunge la valoarea de 5, în laptele fermentat se adaugă enzime proteolitice din cheag, active la acest pH și are loc coagularea enzimatică.

În lapte are loc multiplicarea bacteriilor lactice favorizată de prezența lactozei, a surselor asimilabile de azot (aminoacizi și peptide), a potențialului de oxidoreducere favorabil.

Rolul principal al bacteriilor lactice la fabricarea brânzeturilor este producerea intensă și sigură de acid lactic. Fermentația are loc rapid la concentrație inițială de celule de 1•10⁹ /cm³, care reprezintă masic aproximativ 500 μg substanță uscată per cm³ și necesită pentru sinteza acesteia 260 μg proteine.

Coagularea laptelui constă în transformarea caseinei solubile în paracazeinat insolubil și se poate realiza pe două căi:

- coagularea acidă poate avea loc ca urmare a acumulării de acid lactic rezultat prin fermentație atunci când prin scăderea de pH se ajunge la punctul izoelectric al cazeinei din lapte; se formează paracazeinat insolubil și lactat de calciu;
- coagularea enzimatică se realizează cu enzime proteolitice coagulante, când se obține, prin formarea de paracazeinat insolubil, un coagul compact, mai bogat în calciu. Dintre enzimele coagulante sunt folosite:
 - **cheagul**, obținut prin extragere din stomac de miel (vițel), conține un complex de enzime proteolitice din care fac parte: chimotripsina, tripsina, plasmina și renina;
 - **enzime de origine vegetală**: papaina, bromelaina, ficina, folosite în țări cu climat cald;
 - enzime de natură microbiană, se obțin cu ajutorul unor microorganisme selecționate cu speciile: *Mucor pussilus*, *Mucor miehei*, *Endothia parasitica*.

Prelucrarea coagului. În funcție de sortimentul de brânză, coagulul este supus operației de tăiere (mărunțire), care favorizează separarea zerului. În timpul operației are loc în continuare multiplicarea bacteriilor, iar prin separarea zerului se apreciază că aproximativ 2/3 din microbiota laptelui rămâne în coagul și restul se elimină o dată cu zerul.

Maturarea brânzeturilor. Este o etapă foarte importantă pentru calitatea produsului finit și este rezultatul activității complexe a celulelor microbiene vii, a enzimelor microbiene exogene ale acestora sau a enzimelor eliberate în urma procesului de autoliză a celulelor nevii, precum și a enzimelor native ale laptelui sau adăugate cu cheagul, asupra principalelor componente din coagul și anume: lactoză nefermentată, lactați, acid lactic, protide și lipide. Ca rezultat al formării de lactat de calciu se reduce aciditatea în pastă și devine posibilă activitatea bacteriilor care necesită pentru dezvoltare valori neutre de pH.

La maturare se produce o hidroliză limitată a proteinelor din lapte, în special a cazeinei, cu formarea de compuși cu masa moleculară redusă, ușor digerabili și a aminoacizilor. Prin maturare are loc creșterea gradului de digestibilitate și a valorii nutritive. Aminoacizii rezultați la maturare pot suferi reacții de transaminare, decarboxilare, dezaminare, iar produsele rezultate pot fi aldehide, alcooli ș.a., ceea ce explică diversitatea gustului și aromei. Lipidele sub acțiunea lipazelor produse de culturi sau provenite din cheag sau lapte sunt transformate în glicerol, sursă de carbon pentru microorganisme, iar acizii grași sunt transformați parțial în aldehide, cetone, compuși ce dau un gust picant, specific.

Particularități microbiologice la fabricarea unor brânzeturi

Brânza Camemberti. Microorganismele utile sunt reprezentate de *Lactococcus cremoris* și *Lactococcus diacetylactis*, iar dintre lactobacili *Lactobacillus plantarum* și *Lactobacillus casei*.

După 2 zile de la formare se pulverizează cu spori de *Penicillium camemberti* și maturarea are loc la 12°C și umezeala relativă de 95%. După 10 zile se împachetează în folie și se lasă 20 zile la temperatura camerei. Enzimele fungice difuzează din exteriorul formei de brânză spre interior și se produce maturarea, înmuierea pastei.

Brânza Roquefort. În acest tip de brânză fabricată din lapte pasteurizat domină genul *Lactococcus*, genul *Leuconostoc*, speciile *Lactobacillus plantarum* și *Penicillium roqueforti*.

Brânzeturi cu pastă presată și desen (Emmental, Gruyere, Șvaițer). Se caracterizează prin asociația a două fermentații respectiv lactică, prin inoculare cu

Streptococcus thermophilus, *Lactobacillus helveticus* și *Lactobacillus bulgaricus* și propionică prin inoculare cu *Propionibacterium shermani* care se succed în timp. Fermentația lactică se derulează în primele 24 ore până se atinge un pH de 5,2-5,3 iar fermentația propionică are loc la maturare și durează câteva săptămâni/luni.

Microbiologia brânzeturilor topite. Se obțin prin topirea brânzeturilor maturate cu defecte fizice, la 70-95°C timp de 5-30 minute. Microbiota este alcătuită din microorganisme termotolerante, rezistente la temperatura de topire: streptococi termofili, enterococi, lactobacili și bacterii butirice. După topire numărul de microorganisme vii este de aproximativ $10^3/g$, dar prin păstrare se poate obține o creștere până la valori de $10^6/g$. Păstrarea brânzeturilor topite se impune să se realizeze la temperatura de 8°C.

Alterări microbiene ale brânzeturilor

În condiții de nerespectare a procesului tehnologic și a condițiilor igienico-sanitare la prelucrarea laptelui, în urma activității microorganismelor de contaminare pot avea loc alterări ale brânzeturilor cu modificarea calității senzoriale și pierderea valorii alimentare. Dintre defectele ocazionale întâlnite în brânzeturi cele mai frecvent întâlnite sunt:

- **Balonarea timpurie** – apare după 1-2 zile de la formare și este datorată prezenței în număr mare a bacteriilor coliforme *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis* etc. Aceste bacterii se pot înmulți concomitent cu bacteriile lactice și produc fermentația lactozei cu formarea de acid lactic, acid acetic, CO_2 și H_2 . Ca urmare a degajării intense de gaze, în condițiile în care coaja nu este penetrabilă apare balonarea formei de brânză, iar în secțiune pasta este buretoasă cu alveole mici, neuniforme. Prezența în concentrație ridicată a celulelor de *Escherichia coli*, facultativ patogen, producător de enterotoxine, poate conduce prin consumul brânzei alterate la starea de toxinfecție. Defectul poate fi întâlnit la brânzeturi cu pastă moale tip Camembert, ca urmare a multiplicării în perioada de maturare a bacteriilor coliforme în lapte.

- **Balonarea târzie** – poate apare după 20-60 zile (în timpul maturării brânzeturilor) și este datorată bacteriilor butirice din speciile *Clostridium butyricum* și *Clostridium tyrobutyricum*. Aceste bacterii pot proveni din sol, apă furajă, cheag etc., rezistă la pasteurizarea laptelui și rămân în stare de endospori până când pH-ul crește prin neutralizarea acidului lactic de fermentație la valori mai mari de 6. În urma activității lor prin formare de gaze (CO_2 și H_2) are loc balonarea, deformarea cu rupturi inestetice, neordonate în pastă și sesizarea gustului iute, sălcu, prin acumularea acidului butiric. Balonarea brânzeturilor poate fi dată și de către *Bacillus polymixa* care utilizează ca sursă de carbon lactații cu eliberare de CO_2 .

- **Defectul de gust amar** – este întâlnit în brânzeturi de tip Cheddar și Gouda și poate fi datorat activității proteolitice a culturilor starter sau a celor adăugate cu cheagul. Prin acțiune lipolitică se eliberează acizi grași cu formare de mono și digliceride responsabile pentru gustul amar. În brânza Camembert, Roquefort, pot da gustul amar și culturile fungice. Pentru eliminarea acestui defect prin metode tehnologice este favorizată dezvoltarea bacteriilor producătoare de peptidaze care produc hidroliza enzimatică a peptidazelor amare la aminoacizi.

- **Pătarea brânzeturilor** – este datorată bacteriilor din genul *Pseudomonas*. În condiții de păstrare a brânzei în mediul umed, ca rezultat al proteolizei, se formează tirozina care prin oxidare formează melanine de culoare cenușiu-brun.

- **Mucegăirea brânzeturilor** – defect frecvent ce duce la deprecierea unor cantități mari de produse se caracterizează prin apariția de pete colorate specific, miros caracteristic, degradarea cojii și a zonelor adiacente, risc de formare a micotoxinelor și difuzia lor în pastă. Dintre mucegaiurile izolate din microbiota brânzeturilor alterate fac parte: *Geotrichum candidum* cu activitate proteazică și lipazică, lipsit de potențial toxicogen, *Geotrichum auranticum*, *Monascus purpurens*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, care produc pete diferite colorate (portocaliu, roșu, brun, verzui). Concomitent cu mucegaiurile, pe suprafața brânzeturilor se pot dezvolta drojzii ce dau modificări de culoare și aparțin genurilor *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*.

13. MICROBIOLOGIA CĂRNII ȘI A PREPARATELOR DE CARNE

Carnea este un produs alimentar valoros și reprezintă un mediu foarte bun pentru microorganisme, care beneficiază de un pH = 6,4-6,5, substanțe ușor asimilabile (glicogen și acid lactic) și substanțe asimilabile cu azot.

13.1. SURSE DE CONTAMINARE MICROBIANĂ A CĂRNII

13.1.1. Contaminarea internă

Contaminarea internă a cărnii ca și a organelor este produsă de microorganisme patogene care dau îmbolnăvirea animalului și se localizează în țesutul muscular și organic. Dintre microorganismele patogene, care se pot transmite pe cale digestivă prin consum de carne contaminată fac parte:

- *Mycobacterium tuberculosis de tip bovis* agent al tuberculozei este inactivat prin tratamentul termic al cărnii la 80-85°C timp de 10 minute.
- *Bacillus anthracis*, agent al antraxului, se poate transmite prin carnea de ovine.
- Alte specii pot aparține genurilor *Leptospira*, *Brucella*, *Coxiella* ș.a. care se transmit pe cale cutanată.

Contaminarea cărnii se poate produce și în momentul sacrificării; prin contactul cuțitului cu plaga jugulară pot fi antrenate microorganisme de pe suprafața pielii și părului care sunt transmise prin circulația sângelui în organism. Dacă după sacrificare nu se realizează rapid răcirea și eviscerarea se poate produce un transfer al microorganismelor din viscere și se produce contaminarea cărnii cu microorganisme de origine intestinală, enterobacterii, dintre care sunt facultativ patogene/patogene: *Salmonella typhi*, *Klebsiela*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus*, *Escherichia coli*.

13.1.2. Contaminarea externă

În funcție de condițiile mediului ambiant și condițiile igienice la procesarea cărnii (jupuire, eviscerare, despicare, toaletare) are loc contaminarea externă, când numărul de celule poate ajunge la 10^2 - 10^3 /cm² suprafață carne/carcasă. Prin contaminarea externă pot ajunge pe carne bacterii din genurile: *Pseudomonas*, *Flavobacterium alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus* etc., bacterii de putrefacție, care se pot dezvolta pe carne chiar în condiții de refrigerare.

De la indivizii bolnavi, pe cale aeriană sau prin contact cu mâinile celor care manipulează carnea se pot transmite microorganisme patogene.

În cazul bovinelor, contaminarea externă se poate face la jupuire atunci când accidental, părul cu o încărcătură microbiană de 10^7 - 10^8 /g vine în contact cu carnea, din surse umane, prin mâini murdare și mai ales când eviscerarea este defectuoasă. Pielea și părul sunt surse importante pentru răspândirea lui *Listeria monocytogenes* cu diseminarea acesteia pe carcase de carne prin contact direct/indirect la tăiere, sângerare, jupuire. Prin respectarea regulilor de igienă se reduce numărul și numai 1,2% din carcase de bovine și 8,7% de porcine au conținut *Listeria*. Deoarece îndepărtarea acestora este imposibilă aceste bacterii ar putea fi folosite ca indicator sanitar al condițiilor globale de igienă în abatoare.

Carnea obținută în condiții igienice de la animale sănătoase este lipsită de microorganisme sau poate conține la suprafață un număr redus de cel mult 100 celule per gram ce pot aparține genurilor: *Clostridium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* și numai în cazuri rare pot fi prezente salmonelle.

În cazul porcinelor contaminarea microbiană se poate realiza mai intens dacă opărire se efectuează pe orizontală prin imersare în bazine cu apă la 64-65°C. Prin opărire repetată, apa se încarcă cu microorganisme de pe păr și piele și există pericolul ca pulmonii să se încarce cu un număr mare de microorganisme, măbind riscul de contaminare. O contaminare secundară a cărnii cu mucegaiuri se poate transmite pe calea aerului existent în abatoare.

13.2. ALTERĂRI MICROBIENE ALE CĂRNII

Alterările microbiene ale cărnii sunt dependente de natura și concentrația de microorganisme, de tipul de carne, de umezeala relativă din depozit și de temperatura de păstrare. Se pot întâlni următoarele tipuri de alterări:

- **alterarea superficială** – prin păstrarea cărnii la temperatura de 0-10°C se produce lent deoarece temperaturile scăzute scad viteza de metabolism a microorganismelor, iar modul de alterare este dependent de umezeala relativă a aerului din depozit. Dacă aceasta este mai mare de 80-90% și suprafața cărnii este umedă, este favorizată multiplicarea bacteriilor psihrofile și psihrotrofe ale genului *Pseudomonas*, *Psihrobacter*. La suprafața cărnii se formează un mucus format prin unirea coloniilor și modificarea structurii coloniilor din zona superficială a cărnii, este sesizat mirosul de putrefacție. Dintre bacteriile producătoare de mucus fac parte cele ce aparțin genului *Pseudomonas*, bacterii Gram negative, aerobe, cu activitate lipolitică și proteolitică. Dacă se păstrează carnea la 20°C (temperatura camerei) alterarea are loc mai rapid, ea este mai profundă și poate fi produsă de bacterii mezofile din g. *Achromobacter*, *Escherichia*, *Moraxella*, *Proteus*, *Bacillus*. Alterarea începe de la suprafață spre interior și după consumarea oxigenului de bacterii aerobe, se produce alterarea profundă. Are loc înmuierea țesuturilor, modificarea culorii (roșu – cenușiu), hidroliza și fluidificarea grăsimilor cu formarea produșilor finali de putrefacție (amine și substanțe toxice). În carnea de vită ambalată în vacuum, modificarea culorii roșii și apariția culorii verzi a fost produsă de specii de *Clostridium*, după 10-12 săptămâni de păstrare.

- **Mucegăirea** – la păstrarea cărnii în depozit cu umezeală relativă a aerului mai mică de 75% când suprafața cărnii este zvântată, alterarea poate fi produsă de către drojdii și mucegaiuri. Drojdiile produc rar alterări ale cărnii, ele se înmulțesc mai bine în carnea tocată. Mucegăirea este vizibilă după 1-2 săptămâni de păstrare. În domeniul temperaturilor de refrigerare se dezvoltă multe mucegaiuri. Mucegăirea pornește de la suprafață spre interior și apar pete colorate și miceliul vegetativ poate

să pătrundă în țesut. Dacă mucegăirea s-a instalat, prin spălarea cărnii rămân pete mate colorate diferențiat. Dintre mucegaiurile care se pot dezvolta pe carne în condiții de refrigerare fac parte: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Sporotrichum*.

- **Alterarea totală, superficială și de profunzime**, poate avea loc prin păstrarea cărnii la temperaturi de 10-25°C. Această alterare are loc și atunci când răcirea se face lent după sacrificare și are loc păstrarea la temperatura mediului ambiant. Alterarea globală a cărnii poate să fie evidențiată după 2-3 zile de la sacrificare și este datorată dezvoltării bacteriilor aerobe de putrefacție psihotrofe și mezofile, aparținând genurilor: *Pseudomonas*, *Lactobacillus* formatoare de mucus. Carnea alterată prezintă o culoare cenușie-verzuie, ca urmare a formării de către microorganismele apei oxigenate care reacționează cu pigmentii cărnii.

- **Alterarea profundă** poate avea loc în carne cu contaminare internă, păstrată la temperaturi de 20-45°C. Această alterare se produce când nu se realizează răcirea după sacrificare și climatizarea spațiilor de depozitare a cărnii este necorespunzătoare. Alterarea poate să fie sesizată după 4-8 ore mai ales dacă eviscerarea nu este realizată imediat după moartea animalului și este datorată bacteriilor anaerobe ale genului *Clostridium*.

Pe lângă analizele microbiologice, pentru detectarea alterării se pot folosi markerii chimici care pot reflecta modificările în compoziție până la limita de acceptabilitate, mai rapid decât metodele microbiologice. Astfel, ca un indice de alterare se poate folosi detectarea cadaverinei, histaminei, a acidului D-lactic și gluconic etc.

13.3. MICROBIOLOGIA CĂRNII DE PASĂRE

Carnea de pasăre are valoare nutritivă ridicată și un conținut variabil de apă de la 58% la carnea de curcan la 71% în carnea de pui, încât este un produs ușor alterabil.

13.3.1. Contaminarea internă

Carnea păsărilor vii poate suferi o contaminare internă cu bacterii ale genurilor *Salmonella*, *Corynebacterium* și *Moraxella*.

13.3.2. Contaminarea externă

În timp ce contaminarea internă este ocazională și limitată, contaminarea externă este dificil de evitat și are loc în cursul diferitelor etape tehnologice.

Sacrificarea în abatoarele de păsări este un proces foarte important, de aceea respectarea regulilor de igienă este obligatorie ținând cont că nivelul de contaminare al cărnii depinde de acest proces, iar contaminarea ridicată a cărnii are efect negativ asupra proceselor ulterioare și asupra duratei de păstrare a calității cărnii.

La opărire cu apă cu temperatura de 50-65°C și deplumare (îndepărtarea penelor) se produce concomitent cu reducerea numerică a celulelor microbiene, o diseminare a microorganismelor (provenite din sol, apă, materii de dejecție), aflate pe suprafața penelor și transferul acestora pe carne. La deplumarea mecanică datorită deplasărilor bruște se pot elimina materii fecale, caz în care are loc contaminarea masivă cu enterobacterii.

Eviscerarea în abatorul de păsări se face prin vacuumare și dacă au loc accidentale rupturi ale intestinelor are loc contaminarea cu bacterii din microbiota

intestinală, respectiv cu enterococi și enterobacterii: *Escherichia*, *Salmonella* ș.a. La eviscerare este posibil de asemenea transfer direct de microorganisme pe carne, prin intermediul ustensilelor, a mâinilor.

Spălarea cu apă sub presiune prin dușare conduce la o reducere cu 50-90% a bacteriilor colifome mai ales dacă apa conține 40-60 ppm clor.

Răcirea cărnii de pui se face în căzi cu apă cu gheață. Dar apa poate fi contaminată cu microorganisme nedorite, ca de exemplu *salmonelle*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* ș.a., care pot ajunge în carne.

La cântărire și ambalare poate avea loc o creștere a numărului de microorganisme pe suprafața carcaselor, prin contact direct/indirect, în funcție de gradul de igienă. În condiții igienice adecvate, microbiota cărnii de pui cuprinde specii de microorganisme din genurile *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* și în număr redus, lactobacterii.

Alterarea cărnii de pui – se realizează mai rapid decât a cărnii de vită și este datorată bacteriilor din genul *Pseudomonas* și genul *Moraxella*. Când concentrația de bacterii ale genului *Pseudomonas* ajunge la valori de $10^8/\text{cm}^2$ se observă formarea de mucus. Viteza de formare a mucusului este dependentă de temperatură și durata de păstrare. Astfel prezența de mucus și a mirosului de alterat devine evidentă după 6 zile prin păstrare la 5°C și se reduce la 3 zile când temperatura crește la 10°C. În cazul în care prin activitatea bacteriilor de putrefacție au rezultat amine toxice, consumul cărnii este riscant deoarece aminele sunt termostabile și rezistente la tratamente termice lejere.

În carnea de pasăre ambalată prin vacuumare se poate produce acrirea cărnii datorată activității bacteriilor facultativ anaerobe din genul *Lactobacillus* și ale genului *Brochothrix*.

Prin carnea de pui se pot transmite bacterii patogene din genul *Salmonella*, a cărei contaminare este greu de evitat ținând cont că peste 40% din păsări pot elimina aceste bacterii prin materii de dejecție. Mai pot fi întâlnite *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*.

Controlul microbiologic al cărnii de pui impune absența bacteriilor din genul *Salmonella* în 50 g, iar bacteriile din genul *Clostridium* într-un gram.

13.4. MICROBIOLOGIA CĂRNII DE PEȘTE

Peștii în stare vie prezintă la suprafață un mucus cu proprietăți bactericide și care previne îmbolnăvirea sa în timpul creșterii. Acest mucus reține microorganismele din apa în care peștii trăiesc, astfel încât microflora peștelui este asemănătoare cu a apei. În microflora peștelui de apă sărată se întâlnesc bacterii din g. *Flavobacterium*, *Achromobacter*, în microflora peștelui de apă dulce se întâlnesc bacterii din g. *Alcaligenes*, *Pseudomonas*.

După scoaterea peștelui din mediul natural mucusul își pierde proprietățile bactericide și reprezintă un mediu pentru dezvoltarea microorganismelor reținute de mucus. Dacă peștele este păstrat neeviscerat sub acțiunea permeazelor este posibilă pătrunderea microflorei din intestin în țesut.

Alterarea peștelui se produce mai întâi în zona capului pentru că bronhiile filtrând apa rețin o cantitate mare de molecule ce devin active după moartea peștelui. După scoaterea din apă apare faza de rigiditate, carnea este rigidă, cu pH acid, ce nu permite multiplicarea bacteriilor și rigiditatea se păstrează la 0°C. Dacă peștele este neeviscerat apare defectul de umflare datorat dezvoltării bacteriilor anaerobe din genul *Clostridium*. Dacă peștele este eviscerat și păstrat la temperatura de

refrigerare sau la 20°C defectele sunt produse de *Escherchia coli*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*. Prin activitatea bacteriilor de putrefacție se acumulează amine toxice, astfel încât prin consum de pește alterat se produc intoxicații grave. Peștele se poate păstra doar în stare congelată sau uscat, sărat, afumat.

13.5. MICROBIOLOGIA PREPARATELOR DIN CARNE

Preparatele din carne se obțin într-o gamă largă de sortimente diferențiate prin compoziție, conținutul de apă liberă/valoare a_w , tehnologie și din punct de vedere microbiologic.

13.5.1. Microbiota materiilor prime și auxiliare

În funcție de tehnologia de fabricație, pe lângă carne, organe, grăsimi, ca materii prime, aditivii, ingredientele și alte materii auxiliare introduc un număr variat, cantitativ și calitativ de microorganisme, care suferă modificări importante în etapele tehnologice de preparare.

Carnea tocată. La fabricarea preparatelor din carne se folosește carnea tocată, care poate prezenta o contaminare bacteriană de 10^4 - 10^6 ufc/g. Pe suprafața cărnii tocate la refrigerare, se dezvoltă bacterii ale genurilor *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, care dau modificări ale culorii (cenușiu-brun), cu formare de amoniac și amine, în timp ce în interiorul cărnii tocate, ca urmare a consumului de oxigen de către bacteriile aerobe, se dezvoltă bacterii facultativ anaerobe și se produce acrirea.

Dintre microorganismele patogene întâlnite cu o frecvență mai mare în carnea tocată, fac parte bacterii din g. *Salmonella*, *Staphylococcus* și *Clostridium perfringens*. O carne tocată cu peste 10^7 /g celule bacteriene, nu este admisă la fabricarea preparatelor din carne, iar la creșterea concentrației de celule la valori de 10^8 /g apar evidente modificări senzoriale, specifice putrefacției.

Sarea și amestecurile de sărare. O sursă importantă de microorganisme (10^2 - 10^6 /g), o prezintă sarea, care aduce în compoziție bacterii sporulate, bacterii tolerante la sare, inclusiv drojdii halotolerante. Sarea influențează legarea apei în preparatele din carne tratate termic și ca urmare a reducerii valorii de a_w este considerată factorul cel mai stabilizator din punct de vedere microbiologic.

La fabricarea salamurilor crude se mai pot folosi în calitate de aditivi săruri – nitriți sau nitrați – glucoză, glucono- δ -lactona (GDL), acid ascorbic sau ascorbați, care adaugă în compoziție un număr de microorganisme și influențează microbiota produsului. Prin adăugarea de nitriți și nitrați se menține culoarea roșie a cărnii. Nitriții pe lângă efectul de menținere a culorii roșii caracteristică au rol în dezvoltarea aromei, în protejarea lipidelor de oxidare și cel de inhibare a unor microorganisme. Se cunoaște că nitritul inhibă creșterea multor specii de microorganisme chiar la concentrații relativ reduse.

Condimentele, deși se adaugă în proporții mici, au o încărcătură microbiană foarte mare mai ales în cazul plantelor aromatice care se încarcă cu microorganisme în timpul perioadei de vegetație. Piperul, ienibaharul pot conține 10^5 - 10^6 ufc/g. Din microbiota condimentelor au fost izolate bacterii sporulate și mucegaiuri ce produc micotoxine, de aceea există orientarea de a fi sterilizate înainte de folosire, pe cale chimică.

Membranele, cele naturale (conservate prin sărare) au o încărcătură microbiană ridicată deoarece au venit în contact cu microbiota intestinului (bacterii coliforme și alte bacterii de putrefacție). Din punct de vedere microbiologic

membranele artificiale au o încărcătură foarte redusă și deci nu contribuie la încărcarea produsului cu microorganisme de alterare.

13.5.2. Culturi starter utilizate în industria preparatelor din carne

În tehnologia preparatelor din carne se pot folosi microorganisme sub formă de culturi starter, care se pot adăuga în pastă înainte de umplere sau sunt folosite la pulverizarea superficială a salamurilor uscate.

Culturi bacteriene

Bacteriile lactice - în monoculturi sau culturi mixte, capabile să suprimă creșterea microorganismelor nedorite pot fi folosite drept culturi de protecție în diferite preparate de carne: *Lactobacillus*, *Micrococcus*. Culturile mixte de lactobacili și micrococi dau rezultate bune în reducerea timpului de maturare, o mai bună dezvoltare a calităților senzoriale, inhibarea bacteriilor de putrefacție și astfel prelungesc durata de păstrare a acestor produse. Culturile se adaugă într-un mediu nesteril, de aceea cantitatea culturii de producție adăugată trebuie calculată astfel încât numărul de celule introduse în pasta de carne să fie de cel puțin 1000 de ori mai mare decât cel existent în microbiota cărnii/compoziției. Aceste culturi produc o fermentație lactică determinând astfel o scădere a pH-ului care inhibă activitatea bacteriilor de putrefacție, iar acidul lactic contribuie la obținerea gustului plăcut.

Pentru obținerea salamurilor fermentate se pot folosi culturi mixte alcătuite din lactobacili, micrococi și drojdii.

Culturi fungice

Dintre culturile fungice folosite drept culturi starter cele mai importante sunt cele din genul *Penicillium*, folosite la obținerea salamurilor crude, care influențează pozitiv uscarea naturală și maturarea. Aceste microorganisme se dezvoltă ca un fetru de culoare albă la suprafața batoanelor și prin intermediul hifelor penetrante asigură o difuzie a umidității și o uscare uniformă, iar prin intermediul enzimelor (lipaze, proteaze) contribuie la formarea compușilor de gust și aromă specifice acestor produse.

Sporii de *Thamnidium elegans* inoculați prin pulverizare la suprafața carcaselor de carne de bovine, inhibă dezvoltarea bacteriilor de alterare ceea ce face posibilă creșterea temperaturii și a umezelii aerului din depozit, pentru a reduce timpul necesar pentru maturarea cărnii de la 2 săptămâni la 2-3 zile.

14.3.3. Defecte și alterări microbiene ale preparatelor din carne

Preparatele din carne au o durată de conservare și condiții recomandate de depozitare diferite, în funcție de conținutul de apă liberă pe care îl conțin. Astfel, proaspăturile (parizer, crenwurști, lebăr) cu umiditate mai mare de 65% au o durată de conservare de 48-72 ore la temperaturi de refrigerare, în schimb ce salamurile semiafumate cu umiditate mai mică de 45% au durate de conservare 12-14 zile, iar salamurile afumate semiuscate (salamul de vară) timp de 30 zile la temperatura camerei. Alterarea salamurilor bine maturate și uscate este rar întâlnită. Dintre defectele mai frecvente se menționează:

- **Formarea de mucus** – are loc la suprafața batoanelor este datorată dezvoltării bacteriilor sau drojdiilor, favorizată de umiditatea ridicată sau de apariția apei de condens. Se poate forma frecvent la suprafață sau sub membrană, datorită bacteriilor aerobe și facultativ anaerobe din genurile/speciile: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Lactobacillus viridiscens*, *Brochothrix thermosphacta*.

- **Alterări produse de drojdii** – în câteva cazuri formarea de mucus și apariția petelor albe poate fi datorată dezvoltării de drojdii halotolerante cu specia *Debaryomyces hansenii*.
- **Mucegăirea** – este un defect de suprafață și poate fi datorată mucegaiurilor ce se pot dezvolta în domeniul de refrigerare și care pot proveni din contaminare externă (aer, mâini, utilaje). Dintre mucegaiurile ce dau pete inestetice și colorate fac parte genurile *Penicillium*, *Thamnidium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*.
- **Colorarea** – se caracterizează prin apariția de pete albastre, rar întâlnită, este determinată de unele bacterii din genul *Chromobacterium cianogenum* ce pot proveni din sare sau aer.
- **Acrirea și înverzirea pastei** – este un defect întâlnit la proaspături (parizer, polonez) și este datorată dezvoltării bacteriilor heterofermentative care se pot înmulți în anumite condiții, dând acrirea ca rezultat al formării de acid lactic. Deoarece aceste bacterii produc apă oxigenată, în absența catalazei inactivată prin pasteurizare, aceasta poate produce oxidarea pigmentilor roșii ai cărnii cu formare de porfirine de culoare verde. Acest defect se caracterizează și prin modificarea gustului și este dat de bacterii lactice din g. *Leuconostoc* și *Lactobacillus*, frecvent întâlnite la preparatele din carne cu adaos de ficat, splină.
- **Umflarea** – apare la proaspături și este un defect rar întâlnit, atunci când în pastă sunt prezente bacterii ale speciei *Clostridium perfringens*. Dacă concentrația în celule este mare, se produce o fermentație cu producere de gaze (CO_2 și H_2), se produce umflarea, pasta devine buretoasă și în caz de consum, există riscul de toxiinfecție alimentară.

14. MICROBIOLOGIA OUĂLOR

Ouăle sunt alimente valoroase din punct de vedere nutritiv. Sunt folosite ca atare pentru consum sau în industrie, la fabricarea pastelor făinoase, a produselor de patiserie, în obținerea maionezelor, a prafului de ouă etc.

Ouăle conțin o microfloră facultativ patogenă transmisă de la păsările bolnave și o microfloră de alterare care ajunge în ou prin contaminare externă.

Din punct de vedere structural oul prezintă la suprafață un strat de mucină, solubil în apă, cu efect bactericid. La 1-2 săptămâni de la obținere, efectul bactericid se pierde. Sub stratul de mucină se găsește coaja poroasă, cu pori suficient de mari, pentru a permite trecerea celulelor microbiene (110 pori/cm^2).

Sub coajă se găsește membrana cu conținut ridicat în cheratină, permeabilă pentru vaporii de apă și pentru celulele de dimensiuni mici. Sporii de mucegai cu dimensiuni mari nu trec prin membrana internă.

Albușul se prezintă sub forma unui amestec coloidal cu $\text{pH} = 9,3$ nefavorabil dezvoltării bacteriilor. El nu este un mediu bun pentru multiplicarea bacteriilor deoarece conține lizozim, conalbumina, avidina, substanțe cu efect antimicrobian asupra bacteriilor pozitive pe care le lizează. În albuș mai sunt prezenți inhibitori ai proteazelor vegetale/microbiene ca de exemplu ovostina, cistatina, ovomucoidul. Prin formarea unui strat vâscos între coajă și gălbenuș, albușul împiedică răspândirea microorganismelor. De asemenea în interiorul albușului există o rețea de fibre formate ca rezultat al interacțiunii între lizozim și ovomucină.

Gălbenușul reprezintă un mediu excelent pentru înmulțirea microorganismelor, are un $\text{pH} = 6,9$, este bogat în substanțe nutritive și nu conține substanțe cu efect inhibitor. Experiențele de inoculare artificială în gălbenuș a bacteriilor din genul

Salmonella au stabilit că acestea se înmulțesc foarte bine și pot ajunge la valori de 10^8 /g gălbenuș.

14.1. CONTAMINAREA INTERNĂ

Contaminarea internă se realizează prin contaminarea cu microorganisme de la păsările bolnave sau în timpul formării oului în cazul rațelor și găștelor prin intermediul apei poluate. Dintre microorganismele de contaminare internă amintim:

- genul *Salmonella* cu speciile: *Salmonella enteridis*, *Salmonella galinarium* se pot înmulți în gălbenuș, pot să provină de la păsări care au suferit îmbolnăvirea, fie din contaminarea externă (dejecția altor păsări). Bacteriile din genul *Salmonella* care se răspândesc prin ouă pot produce endotoxine, de aceea prin ingerarea preparatelor din ouă insuficient tratate termic, acestea ajung pe cale digestivă în organism, sub acțiunea sucului gastric are loc liza pereților celulari și eliberarea de toxine, producându-se starea de toxiinfecție alimentară caracterizată prin diaree, dureri de cap și chiar moarte. În timp ce ouăle de găină au o contaminare redusă (0-7%), ouăle de rață pot fi contaminate în proporție de 1-26%, de aceea la prelucrare și comercializare se impun condiții de fierbere de minimum 10 minute pentru a avea certitudinea distrugerii salmonelelor și inactivarea toxinelor pe care acestea le pot produce.
- Genul *Proteus*, cu specia *Proteus mirabilis* în concentrații mari produc boli infecțioase și toxiinfecții alimentare (gastroenterite). Bacteriile se înmulțesc în ou și produc hidrogen sulfurat prin degradarea proteinelor.
- Genul *Clostridium*, cu specia *Clostridium perfringens* poate proveni și din contaminarea externă. În prezența fosfolipidelor din gălbenuș pot produce toxine (6 tipuri de enterotoxine). Prin dezvoltarea acestor bacterii în creme, preparate cu ouă contaminate, se produce eliberarea de toxine și îmbolnăvirea (dacă aceste toxine nu sunt distruse prin tratament termic).
- Genul *Mycobacterium tuberculosis* (tip aviar) produce o contaminare a ouălelor provenite de la păsări bolnave.

14.2. CONTAMINAREA EXTERNĂ

Contaminarea externă. Are loc după expulzarea oului, prin intermediul apei poluate, a aerului din cuibarul contaminat cu dejecțiile păsărilor, prin contacte directe cu mediul și are o pondere de aproximativ 90% din totalul microbiotei. După expulzare, oul are o temperatură de 35-37°C, iar dacă în cuibar este rece, prin contracția conținutului, aerul este aspirat și devine oportună penetrarea microorganismelor aflate pe coajă sau în stratul de aer înconjurător. Numărul de microorganisme pe coajă este în medie de 100000 în funcție de gradul de igienă, cu predominarea bacteriilor Gram pozitive ale genului *Micrococcus* care rezistă bine pe coaja uscată a oului. Dacă oul este în contact cu aerul umed, sporii de mucegai se dezvoltă la suprafață hidrolizând cuticula, facilitând eliberarea porilor și pătrunderea bacteriilor. Pe aceeași cale oul poate fi contaminat cu bacterii patogene transmisibile prin dejecții, aer, aparținând genurilor *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Escherichia*.

14.3. ALTERĂRI MICROBIENE ALE OUĂLOR

În timpul păstrării ouălor, ca urmare a activității microorganismelor de contaminare se pot produce diferite alterări:

Putrefacția verde – conținutul oului capătă o culoare verzuie și prezintă un miros de varză acră; este datorată microorganismelor din genul *Pseudomonas* producând pioverdina pigment de culoare verzuie, cu proprietăți fluorescente.

Putrefacția neagră – este profundă, cu modificarea culorii și degajarea puternică de hidrogen sulfurat datorată bacteriilor din genul *Proteus*.

Putrefacția portocalie – atunci când oul se păstrează la temperatura camerei și este dată de *Bacillus megatherium* ce produce pigmenți portocalii, gaze, amine toxice;

Putrefacția roșie – dată de bacterii din genul *Serratia* care produc un pigment roșu, denumit prodiogiosină.

Mucegăirea – sub coajă, în camera de aer se formează prin pierderea apei; este dată de reprezentanți ai genurilor *Penicillium*, *Cladosporium*.

Pentru industrializare se folosesc numai ouăle de găină ce sunt dezinfectate prin spălare, iar spargerea se face separat sub control, pentru a nu permite introducerea de ouă alterate în procesul tehnologic.

14.4. MICROBIOLOGIA PRODUSELOR DIN OUĂ

Melanjul. După spargere se pierd sistemele naturale de protecție și are loc o contaminare suplimentară, prin antrenarea microorganismelor de pe coajă (motiv pentru care se recomandă spălarea și dezinfecția prealabilă a suprafeței oului), din aer, prin contact cu utilaje, ambalaje, ustensile pentru omogenizare, sursă umană etc. Pentru reducerea numărului de microorganisme din melanj se poate realiza pasteurizarea la 55-60°C timp de câteva minute pentru distrugerea bacteriilor din genul *Salmonella*. Se consideră o pasteurizare suficientă dacă eficiența este de 99%, iar numărul maxim de microorganisme nu depășesc valori de $10^3/\text{cm}^3$ melanj.

În microbiota reziduală după pasteurizare pot rămâne în stare viabilă bacterii ale genurilor: *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Proteus*, *Escherichia*, *Flavobacterium*.

Congelarea melanjului din ouă prelungește conservabilitatea produsului. În produse congelate pot supraviețui bacterii din genul *Bacillus* care pot să prezinte 80% din supraviețuitori restul fiind format din bacterii din genul *Alcaligenes*, genul *Proteus*, care se reactivează atunci când decongelarea este lentă, urmată de păstrarea în domeniul temperaturii eugenezice.

Concentrarea este o altă metodă industrială de conservare, se realizează sub vid, sau prin adăugare de sare/zahăr care conduc la o scădere a indicelui de activitate al apei de la valoarea inițială de 0,97 la valori între 0,8 și 0,85 defavorabile pentru activitatea bacteriilor patogene/toxicogene.

Deshidratarea se poate realiza prin atomizare când are loc o reducere numerică a microorganismelor, în schimb specii de *Salmonella* și de *Escherichia* pot supraviețui. Praful de ou este conservabil dacă umiditatea nu crește peste 5%.

15. MICROBIOLOGIA ALCOOLULUI

Alcoolul de fermentație se poate obține prin procese de fermentație și prin procese chimice. Ca materii prime la noi în țară se folosesc:

- **materii prime amidonase** – cartofi, cereale, ce suferă procese hidrotermice, apoi enzimatic, cu obținerea de plămezi dulci ce sunt apoi supuse fermentației alcoolice;
- **materii prime zaharoase** – melasa (din sfeclă, trestie de zahăr).

Drojdii producătoare de alcool – *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces bayanus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces polysporus*, *Kluyveromyces loderi*, *Hansenula anomala*, *Hansenula fabiani*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia*.

Unele drojdii mutante pot să fermenteze pentoze în condiții slab aerobe aparținând speciilor: *Candida shaetae*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*.

Bacterii producătoare de alcool:

- *Zymomonas mobilis*, bacterie facultativ anaerobă, Gram negativă, sub formă de bastonașe, poate să producă 10-16% vol.alcool;
- *Clostridium thermocellum*, *Acetovibrio cellulolyticus*, au activitate amilazică și celulozolică, se pot folosi în culturi mixte cu drojdii fermentative;
- *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, sunt termofile active la 66-69°C, prezintă dezavantajul de a produce cantități mari de produse secundare de fermentație.

15.1. OBȚINEREA ALCOOLULUI DIN MATERII PRIME AMIDONOASE

Au loc procese de zdrobire (cartofi), măcinare (cereale), apoi are loc gelatinizarea granulelor de amidon pe cale hidrotermică pentru a favoriza la plămădire hidroliza enzimatică a amidonului.

Plămada dulce este trecută în zaharificator, este răcită la temperatura optimă de activitate a enzimelor amilolitice adăugate în scopul zaharificării amidonului. Drojdiile de alcool nu produc amilaze, de aceea se folosesc enzime vegetale sau microbiene pentru transformarea amidonului în glucide fermentescibile.

În fermentația clasică pentru zaharificare se folosesc enzime amilolitice din malțul verde (slad), care conține în cantitate mare α -amilază, β -amilază cunoscute și sub denumirea de diastaze.

Enzimele microbiene sunt mai avantajoase deoarece pot fi dozate cu precizie, pot avea o activitate de zaharificare mai avansată, deoarece pe lângă α și β -amilaze produc și glucoamilaza. Astfel se pot obține avantaje prin reducerea spațiului necesar obținerii malțului și a consumului de energie. Pentru obținerea de amilaze se folosesc microorganisme din genul *Bacillus* cu speciile *B.subtilis*, *B.coagulans*, *B.sthearothermophilus*, care produc α -amilaze termorezistente, active chiar la 90-100°C, astfel fermentația este protejată și sunt inactivate microorganismele contaminante.

Mucegaiuri selecționate pot produce α -amilaze și glucoamilaze folosite pentru zaharificarea plămezilor amidonoase sub formă de preparate brute. În acest scop mucegaiurile se cultivă pe mediu ce conține tărâțe, la pH acid și temperatura de 30°C. Se folosesc mucegaiuri selecționate din genul *Aspergillus*, cu speciile *A.oryzae*, *A.niger*, *A. awamori*, *A.usamii*. Poate produce glucoamilaze și drojdia *Saccharomyces fibuligera*.

După zaharificarea plămezilor amidonoase are loc inocularea cu celule active de drojdii. Drojdiile adaptate la fermentarea acestora au putere de atenuare și capacitatea de a fermenta și dextrinele cu molecule mici.

Tulpinile de drojdii folosite la fermentarea plămezilor amidonoase zaharificate sunt adaptate de a fermenta maltoza. Pentru obținerea inoculului se pornește de la cultura pură care se multiplică mai întâi în laborator, apoi în fabrică în cadrul operației tehnologice de prefermentare. Urmează apoi fermentarea obținându-se în final în plămezile fermentate 8-9% vol. alcool. După fermentare plămada este dirijată la distilare, unde se obține alcoolul brut care prin rectificare trece în alcool rafinat.

15.2. OBȚINEREA ALCOOLULUI DIN MELASĂ

Melasa reprezintă un mediu bun pentru fermentare deoarece conține aproximativ 55 % zaharoză, 2% rafinoză, substanțe minerale, factori de creștere (biotină).

Se utilizează drojdii din specia *Saccharomyces cerevisiae*, drojdii de fermentație superioară, capabilă să fermenteze complet rafinoza. Drojdia trebuie să aibă toleranță la presiune osmotică ridicată deoarece în acest caz se pot folosi plămezi mai concentrate în zahăr.

La obținerea industrială a alcoolului din melasă randamentul în alcool depinde atât de proprietățile biotehnologice ale culturii de drojdie cât și de calitatea melaselor folosite pentru obținerea mediului de fermentare. Melasa are o încărcare microbiană ridicată și se consideră o melasă bună cea care conține până la $2 \cdot 10^3$ celule/g; cea de calitate inferioară are peste $3 \cdot 10^4$ celule/g. Microbiota melasei este formată din:

- bacterii lactice: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* – tolerante la alcool (14°), nu suferă plasmoliza la concentrații ridicate de zahăr;
- bacterii butirice: *Clostridium pasteurianus*, *Clostridium nigrificans* – influențează negativ calitatea melasei;
- bacterii de putrefacție: genul *Bacillus* cu rol în formarea de nitriți;
- bacterii acetice.

În scopul folosirii la fabricarea alcoolului, melasa este diluată și se adaugă și alte substanțe nutritive care favorizează fermentația. Melasa păstrată în stare diluată poate suferi o degradare prin fermentare cu bacterii din genul *Leuconostoc mesenteroides* care produc polimerizarea glucozei cu formare de dextran care îi mărește vâscozitatea și scade conținutul în zahăr fermentescibil.

În tehnologia obținerii alcoolului din melasă, mediul este sterilizat, are loc inocularea cu drojdii adaptate la melasă, fermentația alcoolică durează 24-36 h, apoi au loc operațiile de distilare și rectificare.

Alcoolul de fermentație conține în afară de alcool și alte produse secundare: aldehide, esteri ș.a. Este un produs conservabil având un efect bactericid maxim la 70° alcool, deoarece produce coagularea proteinelor din citozolul celular.

Este folosit pentru obținerea băuturilor alcoolice cu tărie 40-60° alcool, în amestec cu sucuri și extracte din fructe etc.

15.3. OBȚINEREA PRIN FERMENTAȚIE A ROMULUI

În țări cultivatoare de trestie de zahăr (Jamaica, Cuba etc.) din melasă de trestie de zahăr se poate obține prin fermentare și distilare, romul.

Pentru fermentare se folosesc culturi de drojdii: *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, g. *Hansenula* care produc pe lângă alcool etilic și produși secundari cu rol în formarea aromei. Aroma specifică se obține și prin adaosul în plămezi al unor plante aromatizante. Prin distilarea plămezilor distilate se obțin distilate cu 80-88% vol.alcool, care pentru îmbunătățirea calităților senzoriale se păstrează în vase de lemn de stejar timp de 3 ani. Pentru obținerea romului se adaugă caramel (pentru caramel) și se aduce la concentrația de 40-45% vol.alcool (în produsul pentru comercializare).

16. ASPECTE MICROBIOLOGICE LA OBȚINEREA ȘI PĂSTRAREA DROJDIEI DE PANIFICAȚIE

Producerea industrială a drojdiei la nivel mondial depășește 1,8 milioane tone/an din care drojdia de panificație are cea mai mare pondere. În industria panificației se utilizează sub formă de drojdie comprimată (presată) sau sub formă de drojdie uscată activă (ADY).

Drojdia comprimată este o biomasă de celule aparținând speciei *Saccharomyces cerevisiae* – drojdie de fermentație superioară, adaptată să producă fermentarea glucidelor din aluat, folosită ca afânător biologic la fabricarea pâinii și a produselor de panificație. Alegerea acestei specii este determinată de capacitatea sa de a fermenta rapid glucoza, fructoza și zaharoza și după o fază de adaptare, maltoza, principalul diglucid format în aluat sub acțiunea amilazelor din făinuri. O altă calitate este aceea de a avea timpul de generație cel mai scurt comparativ cu celelalte specii ale genului, egal cu 2-2,2 ore la temperatura de 30°C, încât randamentul în biomasă este ridicat. Astfel în condiții optime de cultivare prin parcurgerea stadiilor de multiplicare, din 0,2 kg de drojdie (substanță uscată) utilizată ca inocul starter, în final se pot obține aproximativ 100000 kg de drojdie, proces în care sunt implicate 24 generații de drojdii.

Pentru obținerea drojdiei comprimate se folosește ca materie primă melasa ca sursă de carbon, substanțe minerale, substanțe cu azot, factori de creștere, pentru a crea un mediu favorabil înmulțirii.

Pentru a crea condiții de multiplicare, după inocularea mediului sterilizat, se asigură condiții de aerare, care stimulează activitatea de biosinteză a drojdiei și reducerea timpului de generație. Se cunoaște faptul că în condiții anaerobe drojdia crește mai lent decât în condiții aerobe; raportat la 100 kg zahăr utilizat, randamentul teoretic în biomasă (substanță uscată), în anaerobioză este de 7,5 kg pe când în aerobioză este de 54 kg drojdie.

Calitatea drojdiei depinde de procesul tehnologic care trebuie să se desfășoare în condiții stricte de igienă pentru a evita contaminarea plămezilor, care oferă condiții optime și pentru dezvoltarea altor tipuri de microorganisme.

În cursul procesului de fabricare a drojdiei, în paralel cu multiplicarea drojdiilor de cultură, în diferite stadii de multiplicare (plămezi) se pot dezvolta și alte microorganisme de contaminare ale drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*, care măresc gradul de contaminare a drojdiei finite și determină o scădere a calităților biotehnologice și a conservabilității drojdiei comprimate.

În timpul proceselor tehnologice este posibilă contaminarea cu drojdii atipice din genul *Candida* și genul *Torulopsis*. Aceste drojdii se înmulțesc mai repede decât drojdiile de cultură. Au efect negativ asupra produsului finit, deoarece au activitate fermentativă mică, iar prezența lor în calupul de drojdie influențează durata de păstrare, prin aceea că intră în autoliză mai rapid și astfel oferă bacteriilor de contaminare un substrat favorabil dezvoltării.

Bacteriile se pot înmulți în toate stadiile de multiplicare ale drojdiei de panificație. Multe specii ca *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus cereus* pot proveni din melasă în care pot să formeze nitriți.

Mucegaiurile pot contamina plămezile, dar acestea au viteză de înmulțire mai redusă decât a drojdiilor și efectul lor nu este sesizabil în cursul procesului de fabricație. Sporii care s-au separat odată cu drojdia pot germina în timpul păstrării și produc mucegaierea exterioară sau internă a drojdiei comprimate.

16.1. PROCESE CARE AU LOC ÎN TIMPUL PĂSTRĂRII DROJDIEI COMPRIMATE

În calupul de drojdie celulele de drojdie sunt celule vii separate de mediul în care au fost cultivate. Fiind lipsite de apă și substanțe nutritive în calup ele continuă o activitate lentă de metabolizare. Întreținerea funcțiilor vitale se realizează prin consumarea unor substanțe de rezervă din citoplasmă. Drojdiile conțin o cantitate de 30-120 mg glicogen și 20 mg trehaloză drept glucide de rezervă. Se știe că drojdiile cultivate în diferite condiții (aerobe și anaerobe) se diferențiază după conținutul de glucide de rezervă. Astfel drojdiile cultivate în aerobioză sunt mai bogate în trehaloză, iar în condiții anaerobe predomină glicogenul. De aceea gradul de aerare este important pentru acumularea de trehaloză și deci pentru creșterea viabilității.

Temperatura are un rol foarte important în prelungirea stării de viabilitate a celulelor. Astfel drojdia supraviețuiește perioade mai lungi dacă temperatura de păstrare este apropiată de temperatura de înghețare a apei.

Conservabilitatea drojdiei comprimate este dependentă de intensitatea de desfășurare a proceselor de proteoliză, care încep să se producă după trecerea celulelor în stare de anabioză. Drojdia începe să se autolizeze, după ce sunt consumați compușii de rezervă ai celulei. Ca rezultat al autolizei, calupul de drojdie se înmoaie, devine fluid, activitatea fermentativă scade foarte mult în urma hidrolizei enzimelor (proteine); un astfel de calup este foarte ușor alterabil, reprezentând un mediu nutritiv excelent pentru bacteriile de putrefacție.

În cazul păstrării drojdiei presate de bună calitate (necontaminată) în condiții corespunzătoare de depozitare, autoliza are loc foarte lent în decurs de 1-3 luni. În schimb dacă păstrarea acesteia are loc la temperatura de 35°C, durabilitatea este de numai 135 ore.

Influența microorganismelor de contaminare asupra conservabilității drojdiei de panificație. Prezența în calupul de drojdie presată a microorganismelor de contaminare, determină întotdeauna o accelerare a proceselor ce conduc la alterarea drojdiei. Dacă păstrarea drojdiei presate se face la temperatura camerei, primele celule care intră în autoliză sunt celulele care aparțin drojdiilor atipice, iar produsele rezultate, servesc ca mediu nutritiv pentru bacteriile proteolitice. Acestea, prin enzimele extracelulare elaborate, vor degrada întreaga biomasă de drojdie.

Se apreciază că o drojdie de calitate bună din punct de vedere microbiologic, poate conține până la 2% microorganisme de contaminare. Deoarece un gram de drojdie presată conține aproximativ $5 \cdot 10^9$ celule/g, microorganismele de contaminare pot fi acceptate până la valori de $1 \cdot 10^6$ celule/g, iar dacă numărul lor crește la valori de aproximativ $5 \cdot 10^7$ celule/g, se consideră că drojdia este puternic contaminată. Într-un calup de drojdie care conține de exemplu, în prima zi de păstrare 10^6 microorganisme de contaminare/g, după 10 zile de păstrare la 20÷24°C, numărul microorganismelor de contaminare poate ajunge la valori de 10^8 celule/g drojdie presată (Dan, V., 1999).

În fabricile de pâine, dacă depozitarea calupurilor de drojdie se face la temperaturi mai mari de 10°C și în magazii cu o umezeală a aerului mai mare de 75%, pe suprafața calupului se pot dezvolta colonii de mucegaiuri, care îi depreciază calitatea. Astfel, se poate dezvolta frecvent *Geotrichum candidum* (sinonim cu *Oidium lactis* sau *Oospora lactis*), care formează superficial colonii albe cu aspect făinos; mucegaiuri din genul *Aspergillus* și *Penicillium*, care formează colonii colorate caracteristice și *Mucor mucedo*. Acest mucegai în condițiile păstrării drojdiei la temperatura camerei, poate să elaboreze enzime proteolitice care să favorizeze liza celulelor de drojdie, înmuierea și degradarea calupului de drojdie.

Experimente efectuate privind durabilitatea drojdiei de panificație, au stabilit că bacteriile de putrefacție au un rol deosebit în intensificarea proteolizei în calup. Prin păstrarea drojdiei presate la temperaturi de 35°C, 18÷20°C și 2÷4°C, s-a urmărit periodic durabilitatea, numărul de bacterii de putrefacție și activitatea enzimelor proteolitice, în intervalul de 20 zile.

Ca rezultat al proteolizei, enzimele care catalizează desfășurarea procesului de fermentație alcoolică și care conferă calitățile tehnologice ale drojdiei de panificație sunt astfel degradate și își pierd specificitatea de acțiune.

De aceea, la obținerea industrială a drojdiei de panificație se impune un control microbiologic riguros care să cuprindă toate fazele de producție, prin studierea gradului de igienă și depistarea surselor de contaminare.

Pentru a preveni multiplicarea microorganismelor de contaminare se impune întocmirea unui program riguros de igienă, care să fie respectat cu strictețe, pe fiecare din cele cinci stadii principale de fabricație: pregătirea melasei; multiplicarea drojdiilor; separarea drojdiilor din mediul de cultură; filtrarea-presarea drojdiei; modelarea și ambalarea

Pentru a controla procesul din punct de vedere al riscului de contaminare se poate aplica metoda HACCP, cu evidențierea punctelor din procesul tehnologic care sunt critice pentru realizarea inocuității produsului. Aplicarea sistemului HACCP permite evidențierea și menținerea sub control a riscurilor identificate. Utilizarea HACCP la fabricarea drojdiei de panificație nu garantează faptul că nu vor apare riscuri, ci că ele sunt controlabile. Atunci când apar deviații în punctele critice de control sunt necesare măsuri corective. Metoda are un caracter dinamic și de aceea se va revizui ori de câte ori va fi necesar, odată cu modificarea materiilor prime, perfecționarea utilajelor, a tehnologiei de fabricație sau a tehnicilor de curățire și dezinfecție.

Drojdia de panificație – produs finit reprezintă în final rezultatul eforturilor efectuate pentru a evita contaminarea cu microorganisme străine, calitatea acesteia fiind condiționată de gradul de puritate microbiologică pe care îl prezintă la livrare.

17. MICROBIOLOGIA VINULUI

Vinul, produsul finit al fermentației mustului de struguri, conține peste 500 de componente responsabile pentru aromă și gust, din care majoritatea rezultă în urma activității drojdiilor fermentative.

Diversitatea sortimentelor de vinuri este dependentă de compoziția și caracteristica soiurilor de struguri, de calitatea și cantitatea microorganismelor care acționează în must și de factorii tehnologici, de dirijare a activității microorganismelor de interes.

În tehnologia fabricării vinurilor pot interveni următoarele tipuri de microorganisme:

- a) **Microorganisme permanent utile:** drojzii de fermentație denumite și drojzii de cultură sau drojzii tipice care aparțin genului *Saccharomyces*, cu specia *Saccharomyces ellipsoideus* și specia *Saccharomyces oviformis*, folosită la obținerea șampaniei, a vinurilor speciale (Xeres), vinuri oxidate în care drojdiile se dezvoltă ca o peliculă la suprafața vinurilor favorizând reacția de oxidare rezultând un gust specific.
 - b) **Microorganisme condiționat utile:** drojzii cu putere alcooligenă redusă din genul *Kloeckera*, genul *Torulopsis*, genul *Schizosaccharomyces*.
-

- c) **Microorganisme dăunătoare** în care pot fi incluse drojdiile oxidative care dau defectul de floare a vinurilor, bacteriile acetice și unele specii de bacterii lactice care dau alterări ale vinului la păstrare, mucegaiuri care în mod direct indirect influențează calitatea vinurilor.

17.1. MICROBIOTA STRUGURILOR

La suprafața boabelor de struguri există o microfloră epifită alcătuită din drojdii, bacterii și mucegaiuri. Cantitatea și calitatea drojdiilor prezente pe boabe de struguri variază cu condițiile pedoclimatice. Se cunoaște că habitatul natural al drojdiilor este solul, care conține în medie $2,5 \cdot 10^4/g$, cu valori mai mari în soluri de viță veche. Din sol, prin intermediul aerului, a altor factori fizici și biologici, ajung pe tulpini, frunze, ciorchini/boabe.

Boabele de struguri în faza de coacere au la suprafață un număr redus de celule de drojdii, care nu penetrează pielea protectoare a bobului, în schimb dacă boabele au leziuni și este favorizată eliberarea sucului, numărul lor crește foarte mult.

Recoltarea strugurilor se realizează la maturitatea tehnologică a boabelor și strugurii recoltați sunt transportați la centre de prelucrare. Tehnologic se recomandă ca prelucrarea să se efectueze la cel mult 4 ore după recoltare. În timpul transportului, datorită greutateii lor se pot zdrobi, când se eliberează mustul și poate avea loc o multiplicare rapidă a microorganismelor.

17.2. MICROBIOLOGIA MUSTULUI DE STRUGURI

Mustul de struguri are o compoziție chimică și biologică deosebit de complexă, dependentă de soiul de struguri, gradul de maturitate, condițiile climatice, de recoltare, transport, zdrobire, presare etc.

Prin aceste operații cea mai mare parte din microbiota strugurilor: drojdii, bacterii, mucegaiuri ajung în must, dar condiții favorizante le au drojdiile ca urmare a compoziției mustului: glucide 180-250 g/l, formate din glucoză și fructoză în raport de 1:1, cu cantități mici de zaharoză, precum și surse de azot asimilabile, sub formă de peptide, aminoacizi.

17.3. ROLUL DROJDIILOR LA FABRICAREA VINULUI

Fermentația alcoolică a mustului poate fi un proces spontan determinat de microflora levuriană a mustului, ce are condiții bune de dezvoltare. Sub acțiunea drojdiilor are loc în anaerobioză fermentația alcoolică propriu-zisă prin care glucidele fermentescibile ale mustului sunt metabolizate în alcool etilic, CO_2 și produse secundare ce dau vinului aroma specifică. Fermentația alcoolică a mustului de struguri poate să dureze un timp variabil, între 2-4 săptămâni, în funcție de compoziție, temperatură, natura și densitatea celulelor de drojdie.

Pentru dirijarea fermentației alcoolice se folosesc drojdii selecționate. Folosirea culturilor selecționate este avantajoasă în următoarele concluzii:

- când fermentația decurge lent, ca urmare a numărului scăzut de drojdii pe strugurii spălați de ploii sau când mustul obținut din struguri mucegați este tratat cu doze crescute de SO_2 ;
- când fermentația se desfășoară la temperaturi scăzute;
- pentru fabricarea vinurilor spumante;
- fermentarea la rece a vinurilor roșii.

Ca urmare a colaborării între geneticieni, biochimisti și tehnologi, în ultimul timp au fost obținuți mutanți ai drozdiilor de vin, cu anumite performanțe:

- capacitatea de fermentare a mustului cu 300 g zahăr/l;
- separarea rapidă la sfârșitul fermentației, prin floculare;
- toleranța superioară la alcool;
- capacitatea de fermentare la 10-12°C, calitate importantă pentru țări cu temperaturi mai scăzute.

Utilizarea de culturi pure de drojdii cu proprietăți biotehnologice cunoscute este practică pe scară restrânsă. Selecționarea se realizează în institute de cercetare, în laboratoare centrale de vinificație și sunt livrate în funcție de necesități. Prin utilizarea de culturi selecționate mustul fermentează rapid, are loc fermentația completă a glucidelor, ca rezultat se formează cu 0,5-1% mai mult alcool decât în fermentația spontană, vinul conține mai puțini acizi și esteri volatili, are un gust și miros ce permite evidențierea soiului de struguri, este mai puțin sensibil la alterări microbiene, se limpezește ușor.

17.4. ALTERĂRI MICROBIENE ALE VINURILOR

Vinul după condiționare poate să fie lipsit de microorganisme vii și prin învechire își poate îmbunătăți caracteristicile senzoriale (armonizarea gustului, formarea buchetului specific).

Un vin de calitate, stabil din punct de vedere microbiologic, poate să fie steril atunci când s-a produs prin filtrare îndepărtarea totală a microorganismelor sau să conțină un număr redus de drojdii 800-900 celule/dm³.

Defecte produse de drojdii

- **tulburarea vinului** – în producție sau în rețeaua comercială adesea se poate observa că vinul limpede, repartizat la sticle își pierde rapid din strălucire, se tulbură și formează un sediment. Această tulburare este datorată unei fermentații secundare produsă de drojdii care au ajuns în vin de pe utilaje, diferite materiale. Prin examinarea la microscop a sedimentului pot fi evidențiate celule vii de drojdie, avantajate în dezvoltare de prezența unor glucide nefermentate cât și a oxigenului cu care vinul se îmbogățește în diferite operații tehnologice.

- **Refermentarea** – poate avea loc și în vinuri albe sulfite dulci și poate fi datorată drozdiilor sulfitorezistente ale genului *Schizosaccharomyces* ce produc fermentarea zahărului rezidual cu formarea pe lângă alcool etilic și dioxid de carbon, a acidului acetic și a acetatului de etil. Prin refermentare vinul se tulbură, spumează energic la deschiderea recipientului și are un gust acru.

Floarea vinului apare în special, în vinurile cu grad alcoolic scăzut, neprotejate antiseptic și antioxidant și păstrate în condiții de aerare. Boala este produsă de drojdii mycodermice care aparțin mai multor genuri: *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*. Specia care deține ponderea cea mai ridicată este *Candida vini*. Agenții patogeni activează intens la temperaturi de 24÷26°C. Într-un stadiu avansat al bolii vinul își schimbă aspectul, aplatizându-se, au loc degajări de CO₂, apar mirosuri străine neplăcute, iar gustul devine fad și neagreabil.

Boli și defecte produse de bacterii

Oțetirea vinului este o boală care apare în vinurile slab alcoolice, dar poate fi întâlnită și la cele cu grad alcoolic mijlociu (11÷12,5% vol.). Agenții patogeni ai oțetirii vinului sunt bacterii din genul *Acetobacter*. Condițiile care favorizează activitatea bacteriilor sunt:

- temperatura ridicată;

- accesul aerului;
- lipsa SO₂;
- aciditatea scăzută;
- pH-ul ridicat;
- lipsa măsurilor corespunzătoare de igienă vinicolă.

Nu există mijloace eficiente de tratare a vinurilor bolnave de oțetire.

Manitarea vinului apare în special la vinurile roșii, la care fermentarea s-a oprit din cauza unor temperaturi excesive, de peste 38°C. Ea se manifestă prin apariția în vin a unui gust acru-dulceag, deosebit de neagreabil. Agenții care produc această boală sunt bacteriile lactice care transformă fructoza în manitol. Nu există mijloace de tratare a bolii, ci numai de prevenire.

Înăcrirea lactică sau borșirea vinului apare în toamnele deosebit de călduroase sau când fermentația alcoolică s-a oprit, înainte ca întregul conținut în zahăr să fi fost transformat. Agenții patogenii sunt bacteriile lactice. În vinul bolnav se mărește conținutul în acid lactic, în aciditate volatilă și azot amoniacal, iar prin hidroliza polizaharidelor se formează unele hexoze și pentoze, care conferă vinului aspectul vâscos. Nu există mijloace de tratare.

Fermentația propionică sau degradarea acidului tartric apare la vinurile tinere, cu conținut scăzut în alcool și aciditate și care conțin zahăr rezidual.

Bacteriile lactice degradează acidul tartric sau sărurile lui, cu formare de acid acetic, lactic și propionic, acesta din urmă imprimând caracterul de bază al bolii. Vinul se prezintă tulbure, cu nuanțe de oțetire și gust neplăcut, dezagreabil. Vinurile albe prezintă o culoare cu nuanță roșie-brună, iar cele roșii, cenușie-brună.

Băloșirea vinului apare frecvent în zonele cu climat mai răcoros, fiind afectate mai mult vinurile tinere, slab alcoolice, sărace în tanin, cu aciditate moderată, bogate în substanțe azotate și cu zahăr rezidual. Agenții patogeni ai bolii sunt specii de bacterii lactice, la care se pot asocia și bacteriile acetice. Vinul bolnav se tulbură și capătă un aspect vâscos, de consistență mucilaginoasă.

Amăreala vinului se întâlnește numai la vinurile roșii vechi îmbuteliate. Agenții patogeni sunt bacteriile lactice care atacă glicerolul transformându-l în acroleină, care se combină cu polifenolii rezultând compuși insolubili, care imprimă vinului gustul amar. Culoarea vinului capătă nuanțe brune sau cărămizii, uneori negre-albăstrui. În vin se formează un sediment lipicios, mucilaginos, de culoare brună.

Izul specific de șoarece se manifestă prin apariția în vin a unui gust specific, neplăcut și a unui miros de urină de șoarece (acetamidă). Agenții specifici sunt bacteriile lactice, unele mucegaiuri, drojdiile din genul *Brettanomyces* și alte bacterii.

La început apare o slabă tulburare, care se intensifică rapid formându-se un sediment voluminos, ușor mobil și de culoare cafenie-deschisă. Vinurile afectate prezintă și un conținut ridicat de acizi volatili.

Defecte produse de mucegaiuri

Mucegaiurile pot avea o influență indirectă asupra calității vinului la păstrare.

Botrytis cinerea, prin eliberarea de oxidaze în cazul vinului obținut din boabe mucegăite, poate produce la transvazarea vinului, în contact cu oxigenul din aer, casa oxidazică cu modificarea culorii, apariția de precipitat și gust de oxidat sau de vin fiert.

În mustul fermentat, au condiții să se dezvolte în anaerobioză, sporangiosporii ai mucegaiurilor din genul *Mucor* cu formarea de celule similare drojdiilor, care pot produce 1% alcool etilic prin fermentație. Mucegaiuri din genul *Penicillium*, în pivnițe

cu umezeală relativă a aerului de peste 75%, pot produce mucegăirea dopurilor de plută și a lemnului.

Cladosporium cellare se dezvoltă preferențial pe pereții pivnițelor, lemn, dopuri. Este adaptat la condițiile existente, folosind în nutriție substanțele volatile, azotul din aer sau obținut prin digerarea insectelor. Formează un fetru măsliniu-negru, caracteristic pivnițelor vechi.

18. PROCESE MICROBIOLOGICE LA FABRICAREA BERII

Obținerea berii este unul din cele mai vechi procese biotehnologice care folosesc drojdiile pentru a transforma glucidele fermentescibile în alcool etilic și dioxid de carbon. Primele date privind microbiologia berii sunt descrise de Louis Pasteur în 1876, în cartea "Etudes sur la biere".

Drojdia de bere aparține grupei ascosporogene, familia *Saccharomycetaceae*, genul *Saccharomyces*. Acest gen se distinge prin următoarele caractere:

- înmulțirea celulelor se face prin înmugurire;
- formează uneori pseudomiceliu;
- spori sunt de obicei rotunzi sau ovali;
- fermentează întotdeauna alcoolic și nu asimilează azotații.

Din punct de vedere al fermentării există:

- **drojdii de fermentație inferioară** – *Saccharomyces carlsbergensis* – care fermentează la temperaturi scăzute, mergând până la 0÷1°C și care se depun pe fundul vasului la sfârșitul fermentației;
- **drojdii de fermentație superioară** – *Saccharomyces cerevisiae* – care fermentează la temperaturi ridicate, iar la sfârșitul fermentației se ridică la suprafața lichidului.

Primele drojdii de bere de fermentație inferioară au fost izolate în cultură pură la Laboratorul din Carlsberg (Danemarca) de către E.C. Hansen (1908), cultură considerată o specie distinctă, *Saccharomyces carlsbergensis*.

Clarificarea aspectelor microbiologice ale fermentației au fost posibile și datorită dezvoltării unor noi utilaje de fermentare. În ultimii 20 de ani, prin metode de fermentație noi s-a redus substanțial timpul necesar pentru fermentare, prin folosirea unor cantități mai mari de drojdie, folosirea de temperaturi de fermentare mai ridicate și de menținerea celulelor de drojdie într-o stare activă. Pe lângă acestea, tehnologia de imobilizare a celulelor de drojdie, asigură prelungirea perioadelor de fermentare, comparativ cu metodele tradiționale.

Drojdia de bere, *Saccharomyces carlsbergensis*, utilizată ca starter al fermentației, poate proveni din culturi pure de laborator sau prin recuperarea celulelor dezvoltate la o șarjă precedentă de fermentare. Alegerea unei anumite tulpini de drojdie pentru obținerea berii, în condiții specifice de aprovizionare cu materii prime, dotării și tehnologiei folosite, se realizează luând în considerare principalele caractere specifice ale drojdiei de bere:

- *gradul final de fermentare și viteza de fermentare;*
- *capacitatea de asimilare a substanțelor ce participă în metabolism;*
- *randamentul de multiplicare;*
- *capacitatea de floclulare și sedimentare;*

- *spectrul și cantitatea de produse secundare ale fermentației cu implicații în gustul și aroma berii;*
- *rezistență față de degenerare, contaminare, ș.a.*

Realizarea acestei alegeri este mult mai dificilă decât a celorlalte materii prime pentru bere. Încercările de a caracteriza drojdiile care se comercializează au arătat că cele mai multe dintre ele sunt alcătuite din specii diferite care adeseori posedă proprietăți de floclare. În practica industrială apar mutații nedorite ce împiedică floclarea.

Pregătirea culturii pure de drojdie se face în general în două faze și anume:

- faza de laborator;
- faza dezvoltării în instalația de culturi pure.

18.1. ALTERĂRI MICROBIENE ALE BERII

Berea, în funcție de sortiment, prezintă o compoziție variată, cu valoare nutritivă, iar diferitele componente ale berii pot servi drept substrat pentru activitatea microorganismelor ce contaminează berea. Alterarea poate fi dată de un număr redus de microorganisme, deoarece în bere există anumiți factori defavorizanți, respectiv o cantitate mică de extract ușor asimilabil, prezența de alcool, pH-ul acid, anaerobioză, presiune dată de dioxidul de carbon, temperaturi reduse la păstrare (4-15°C). Alterarea microbiologică a berii poate fi dată de drojdiile și bacterii.

Alterări produse de drojdiile

- **Dezvoltarea drojdiilor de cultură** – când filtrarea nu a fost eficientă, drojdiile din genul *Saccharomyces carlsbergensis* pot continua fermentația, produc tulburare, formează rapid un sediment stabil, iar la deschiderea ambalajului spumarea este mai intensă, berea are extractul mai redus și o cantitate mai mare de alcool.

- **Dezvoltarea drojdiilor de contaminare** – unele drojdiile atipice *Saccharomyces pasteurianus*, *Saccharomyces turbidans*, pot produce contaminarea drojdiei de cultură și dau un gust specific, berea este tulburată, tulburarea este mai stabilă deoarece aceste drojdiile au celule mai mici ce rămân mai mult timp în suspensie, iar sedimentul este pulverulent. Alte drojdiile de alterare aparțin genurilor *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Pichia* etc. Prezența lor poate avea efect negativ asupra stabilității spumei deoarece ele pot elibera proteaze prin autoliză. Unele specii pot câștiga în competiție datorită avantajului de a utiliza dextrine sau de a avea caracter killer.

Alterări produse de bacterii

Unele bacterii sunt adaptate la condițiile existente în bere și prin activitatea lor de metabolism, produc opalescență persistentă și importante modificări ale gustului, iar berea nu este acceptată în consum. O cauză a alterării berii este datorată contaminării secundare; se consideră că 60% din contaminarea secundară are loc la umplere și capsare, datorită existenței unor locuri greu accesibile pentru dezinfecție la mașina de îmbuteliat.

Printre bacteriile de alterare a berii se numără lactobacilii heterofermentativi, care sunt mai puțin sensibili la acțiunea microbiostatică a rășinilor din hamei, pot produce diacetil, opalescență și creșterea vâscozității. Alterarea berii cu lactobacilii se caracterizează prin turbiditate fină asociată de gust acid și arome nedorite de acetoină sau de unt (diacetil).

Bacteriile aerobe din genul *Acetobacter* sunt active dacă berea este păstrată cu gol de aer; produc acid acetic, peliculă și opalescență. Acirea berii poate fi dată de *Acetobacter pasteurianus* și *Acetobacter xylinum*. Prin activitatea lor în bere se

produce turbiditate, creșterea vâscozității asociată cu o pierdere în conținutul de alcool datorită formării acidului acetic. Berea devine filantă, acră și are o culoare modificată.

Bacterii din genul *Zymomonas* au fost izolate din bere, de pe suprafața echipamentelor din fabrici de bere și de pe periile folosite la mașinile de spălat sticle. Când berea este alterată cu *Zymomonas* se formează turbiditate și un miros neplăcut de mere putrede, datorat urmelor de aldehydă acetică, H₂S și alți compuși cu sulf, acizi grași, compuși fenolici, diacetil, creșterea vâscozității. În timpul verii prin păstrarea la cald, alterarea poate avea loc în 2-3 zile ca urmare a creșterii bacteriilor și a formării de aldehydă acetică. În berea obținută prin fermentare la temperaturi scăzute (8-12°C) nefavorabile pentru creșterea lui *Zymomonas* incidența acestor bacterii este redusă.

Bacteriile anaerobe din genul *Pectinatus* produc în bere H₂S, acid acetic, acid propionic și opalescență.

Prezența dioxidului de carbon și nivelul redus de oxigen previne creșterea multor microorganisme, dar facilitează supraviețuirea și multiplicarea bacteriilor anaerobe din g. *Pectinatus* și *Megashera* ce pot fi cauza a 5-54% din alterări.

Bacteriile sporulate nu au fost detectate în bere.

Bacteriile patogene și facultativ patogene nu rezistă în bere, prin inocularea berii cu *Escherichia coli* celulele și-au pierdut viabilitatea după 48 ore.

Berea este un produs stabil datorită pH-ului redus, prezenței constituenților hameiului, nivel redus de oxigen și nutrienți, prezența alcoolului care limitează creșterea patogenilor, în schimb riscul de creștere a acestora, există la berea fără alcool.

19. MICROBIOLOGIA OȚETULUI

Fabricarea vinului se cunoaște de aproape 10000 de ani și se poate imagina că și producerea de oțet, care este de fapt un „vin acru” rezultat prin fermentația vinului cu bacterii acetice, este la fel de veche. În prezent la nivel mondial se fabrică diferite sortimente de oțet și pe lângă oțetul din vin, în funcție de zona geografică, se pot obține oțet de mere (din cidru), oțet de orez, din sucuri de fructe citrice, din alcool, din malț sau bere, de tarhon, de petale de trandafir și alte surse.

Se estimează că media pe cap de locuitor, consumul de oțet din țările industrializate este echivalentă cu 1l oțet cu 10% aciditate pe an. Se mai poate obține din alcool purificat (spirt vinegar sau distilat vinegar) ce poate fi obținut cu aciditate mai mare de 18% g/v.

Particularități ale fermentației acetice în condiții industriale

La fabricarea industrială a oțetului în funcție de natura materiilor prime se folosesc tulpini adaptate care dau randamente superioare de producere a acidului acetic. Cu ani în urmă cea mai mare cantitate de oțet se obținea prin procedeul lent „Orleans”. Începând cu secolul al XIX-lea în Germania este introdus procedeul rapid, mai eficient și mai ușor de controlat.

Un acetator simplu este format dintr-un vas tronconic înalt, umplut cu rondele de stejar, prevăzut cu sistem de aerare și recirculare a mediului de cultură, până la atingerea concentrației de 9-10 grade acetice. La pornirea fermentației se efectuează sterilizarea rondelilor și pulverizarea suspensiei de bacterii acetice care rămân fixate în fibrele lemnoase și în prezența mediului răspândit uniform și a aerului are loc

acumularea oțetului. În acest procedeu randamentul de conversie a alcoolului la acid acetic este de 75-80%.

Performanțe superioare se obțin cu generatorul de oțet Frings și alte sisteme în care randamentul de conversie este de 95%.

Frings a adus îmbunătățiri procedeuului asigurând o aerare puternică și controlul temperaturii încât în prezent se consideră că 30% din instalațiile prezente funcționează după acest procedeu.

Bacteriile acetice fac parte din ordinul *Pseudomonadales*, familia *Pseudomonadaceae*, genul *Acetobacter*, larg răspândite în natură pe materiale vegetale care au suferit fermentația alcoolică.

După atingerea gradului de aciditate dorit, oțetul se pasteurizează și /filtrează pentru îndepărtarea impurităților. Pentru îmbunătățirea calităților senzoriale oțetul de fermentare este supus învechirii în butoaie pline (de stejar) în care au loc: oxidarea lentă a aldehidelor, formarea de esteri și stabilizarea calității.

În țara noastră se obține industrial oțet de 9° (grade acetice). Este un produs stabil din punct de vedere microbiologic deoarece la această concentrație în acid acetic, nu este posibilă creșterea microbiană.

20. MICROBIOLOGIA CEREALELOR, FĂINURILOR ȘI PRODUSELOR DERIVATE

21.1. MICROBIOLOGIA CEREALELOR

La suprafața cerealelor există o microfloră foarte bogată alcătuită din microflora epifită (de suprafață) ce se atașează la suprafața bobului în timpul formării, creșterii și maturizării bobului și microflora ce provine din sol și ajunge pe bob prin intermediul factorilor naturali în timpul recoltării, transportului și depozitării. Există și o microfloră de contaminare prin contactul cu solul, praful a mijloacelor de transport. În funcție de sursa de proveniență microflora poate fi:

- a) **microflora de câmp**, în care predomină microflora epifită în care există în cantitate mare bacterii și actinomicete: bacterii – *Pseudomonas herbicola*, bacterii din genul *Micrococcus*, *Lactobacillus*, mucegaiuri din genul *Alternaria* (40% din total), *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Fusarium*;
- b) **microflora de depozit**, întâlnită în cerealele depozitate un timp mai îndelungat: bacterii – *Pseudomonas herbicola*, bacterii din genul *Bacillus*, *Micrococcus*, mucegaiuri din genul *Aspergillus*, *Penicillium*.

În timpul depozitării dacă umiditatea boabelor se află sub 13-14% (deci apa liberă este insuficientă pentru a favoriza creșterea microorganismelor) se constată o scădere numerică a microflorei și în special mor formele nesporulate. Dacă apar condiții favorabile de absorbire a umidității din aer și în bob începe să apară apă liberă sunt favorizate mucegaiurile pentru că ele sunt xerofite (necesită cantități mici de apă pentru a putea să germineze). Aceste mucegaiuri au și echipament enzimatic bogat astfel încât pot să degradeze proteinele din bob, ele se dezvoltă la temperatura de depozitare a cerealelor.

În timpul depozitării pot apare condiții favorabile pentru creșterea conținutului de apă datorită unui fenomen numit hidrodifuzie, proces fizic prin care umiditatea dintr-un material difuzează întotdeauna spre stratul mai rece al masei, apa de condens favorizând creșterea mucegaiului. Apariția condensului este determinată de modificări bruște ale temperaturii masei de boabe, comparativ cu mediul ambiant, de obicei iarna și primăvara.

În condiții favorabile de umiditate, ca urmare a germinării sporilor de mucegai, aceștia se înmulțesc activ și prin respirație degajă o cantitate mare de căldură, de sute de ori mai mare decât cea degajată de boabe. Pentru că masa are o termoconductibilitate scăzută apar straturi sau focare de încingere. În acest caz se intervine prin dispersarea și aerarea boabelor. Dacă nu se intervine, ca urmare a căldurii degajate prin activitatea mucegaiurilor are loc treptat o creștere a temperaturii masei de boabe, care în cazul cerealelor ajunge la un maxim de 55°C.

Prin creșterea treptată a temperaturii în diferite etape de încingere au loc modificări în compoziția microflorei cerealelor. În prima etapă de încingere când temperatura ajunge la 30-35°C are loc o înmulțire a majorității microorganismelor mezofile (bacterii, mucegaiuri).

Dacă temperatura crește la 30-55°C are loc o inactivare a sporilor de mucegai, o reducere a bacteriilor nesporulate, rămân active și cresc numeric doar bacteriile termofile (în special cele din genul *Bacillus*).

După ce s-a atins un maxim al incingerii, treptat începe faza de declin și are loc o răcire treptată explicată prin faptul că au fost inactivate mucegaiurile, iar umiditatea începe să migreze spre stratul mai rece și nu mai asigură condiții de înmulțire și activitate microbiologică.

În urma încingerii și mucegăirii cerealelor au loc importante modificări ale calităților lor tehnologice:

- modificări ale calităților senzoriale: culoarea boabelor devine mată, își pierd strălucirea, uneori în zona embrionului apare o pată colorată în brun spre negru și întregul bob se colorează în maro spre negru (rezultă boabe carbonizate). Explicarea colorării este următoarea: sub acțiunea microorganismelor se formează compuși de tip aminoacid și zaharuri reducătoare (glucoză, fructoză); prin creșterea temperaturii la încingere au loc reacții Maillard cu formare a melanoidinelor de culoare brun-negru. Mirosul este modificat. Apare un miros și gust de mucegai datorită unor mirosuri ce se fixează bine de componentele bobului și poate fi regăsit în făină și pâine. Boabele mucegăite pierd din greutate, devin ușoare, zbârcite, ca urmare a consumării substanței utile a bobului;
- boabele mucegăite își pierd capacitatea de germinare, deoarece mucegaiurile din genul *Aspergillus*, *Penicillium* localizate în germene sau embrion distrug structura acestuia (se mai numesc și mucegaiuri sterilizante).

Cerealele mucegăite își pierd valoarea alimentară și nu mai pot fi folosite în furajarea animalelor pentru că există riscul de dezvoltare a unor mucegaiuri ce pot produce toxine: genul *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*.

20.2. MICROBIOLOGIA FĂINURILOR

Cercetările microbiologice efectuate pentru diferite făinuri și crupe au dovedit prezența diferitelor grupe de microorganisme în număr ce variază de la 10^1 - 10^6 ufc/g. În făinurile de calitate normală, microbiota este formată predominant din bacterii și în cantitate mai mică se întâlnesc drojdiile și mucegaiurile.

În loturile de făină proaspăt măcinată, microbiota are o compoziție similară cu cea a cerealelor. Diferența între cantitatea de microorganisme conținute de cereale și cea care trece în făină, va depinde de caracterul curățirii cerealelor înainte de măcinare și de gradul de extracție al făinii.

Cantitatea de microorganisme din făinuri mai depinde de condițiile de transport și depozitare, de calitatea ambalajului și alți factori. În microbiota normală a făinurilor trebuie să fie absente salmonellele, stafilococii coagulazo-pozitivi și alte

bacterii patogene pentru om. Prezența unor astfel de bacterii, dovedește un grad de igienă necorespunzător și o contaminare a acestor produse prin intermediul rozătoarelor.

Comparativ cu cerealele, făina este un produs mai puțin stabil din punct de vedere microbiologic. Deoarece în făină lipsesc sistemele de apărare existente în bobul integru, reprezentanții microbiotei cerealelor care ajung în făină vin în contact direct cu substanțele nutritive pe care aceasta le conține și din acest motiv, odată cu apariția condițiilor favorabile de umiditate și temperatură, se înmulțesc activ, dând alterări ale făinei.

S-a stabilit că în făina care are o umiditate de 14% și care este păstrată în condiții normale în silozuri de făină, nu are loc o multiplicare a microorganismelor și treptat are loc o reducere a numărului lor.

Dacă în timpul păstrării făinii apar condiții care să favorizeze termohidrodifuzia și umiditatea crește cu 1-2% peste umiditatea de 14%, atunci făina devine un mediu favorabil dezvoltării microorganismelor. Fenomenul de termohidrodifuzie se poate produce atunci când are loc înmagazinarea făinii calde, pe podeaua rece din beton, piatră etc., sau când, dintr-un anumit motiv, are loc încălzirea unuia din straturile făinii, condiții care determină transferul umidității din făină spre straturile mai reci, care își vor mări astfel umiditatea. Termohidrodifuzia apare și la transportul făinii în vagoane, când există diferențe mari între temperatura făinii și cea a mediului ambiant. Ca rezultat al creșterii umidității, se produce în timp o alterare a calității făinii.

Alterări ale făinii

Dintre toate tipurile de alterări microbiene ale făinurilor, mai frecvent întâlnite sunt: mucegăirea, încingerea și acrirea.

Mucegăirea este tipul de alterare cu frecvența cea mai mare de răspândire. Odată cu creșterea umidității peste valoarea umidității de conservare (maximum 15%), sporii de mucegaiuri germinează și prin intermediul hifelor, se răspândesc cu ușurință în interiorul loturilor de făină. Ca rezultat al dezvoltării mucegaiurilor se produc modificări ale mirosului și gustului care, în cazul făinurilor, se transmit și produselor de panificație. În făina mucegăită, au loc modificări ale calităților tehnologice, concretizate prin creșterea acidității, ca rezultat al hidrolizei lipidelor de către enzimele fungice și formării acizilor organici, prin metabolizarea glucidelor. Glutenul capătă o culoare mai închisă, are o elasticitate mai redusă și se reduce cantitativ.

Speciile de mucegaiuri ce se dezvoltă preferențial în făină fac parte din genurile: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* și *Rhizopus*; unele dintre ele pot elabora în anumite condiții micotoxine.

Încingerea. Rolul negativ al microorganismelor în încingere este mult mai evident în cazul făinurilor decât la cereale. În făina proaspăt măcinată și care a suferit procesul de încingere, au loc importante modificări fizice și biochimice, cu o intensitate mai mare decât în cazul cerealelor.

Ca rezultat al mucegăirii și încingerii se produce o pierdere a pulverulenței făinii, capacității de curgere și făina se poate transforma într-o masă compactă.

Acrirea este rar întâlnită la făină și mălai, atunci când umiditatea lor este mare și sunt absenți sporii de mucegai. Acrirea este caracterizată printr-o mărire accentuată a acidității, datorată dezvoltării bacteriilor acidifiante, care metabolizează glucidele cu formarea de acizi organici. Dezvoltarea bacteriilor acidifiante (genul *Lactobacillus*) are loc concomitent cu cea a bacteriilor care produc degradarea

amidonului până la glucide simple, din genul *Bacillus*, între aceste grupe de bacterii se stabilesc astfel, relații de metabioză.

Pentru a evita alterarea microbiologică a făinurilor care conduce întotdeauna la o reducere a calității lor, depozitarea trebuie să se facă la temperaturi sub 12°C în încăperi cu o umezeală relativă de 60-70%.

20.3. MICROBIOLOGIA PÂINII ȘI A PRODUSELOR FĂINOASE

La fabricarea pâinii se folosesc drept materii prime: făina, apa, sarea și drojdia comprimată, materii care introduc în procesul tehnologic o microbiotă caracteristică, în componența căreia intră:

- microorganisme utile, celule de drojdie (*Saccharomyces cerevisiae*), bacteriile lactice și propionice;
- microorganisme indiferente, care nu se multiplică în condițiile unui proces normal;
- microorganisme dăunătoare care dau defecte și boli ale pâinii.

Totalitatea microorganismelor introduse odată cu aceste materii prime suferă transformări cantitative și calitative și determină în cursul procesului tehnologic, modificări ce conduc la obținerea unui produs finit de bună calitate sau la alterare.

Pentru declanșarea proceselor fermentative principale ce au loc la fabricarea pâinii se introduce în aluat drojdie comprimată sau maia de drojdie. În aluat, preparat din apă 60%, sare 1,5% și 2% drojdie comprimată, va conține aproximativ 12×10^7 celule la 1 gram aluat. Cunoașterea caracterelor fiziologice ale celulelor de drojdie a condus la folosirea în panificație a drojdiilor lichide, folosite în proporție de 10% la fabricarea maielelor. În drojdiile lichide este favorizată multiplicarea și adaptarea celulelor de drojdie, încât acestea fermentează mai rapid maltoza și au o activitate fermentativă de 4 ori mai mare decât a drojdiei comprimate. Maiaua reprezintă un sistem complex cu umiditate de 62-65% și care prin menținere la temperaturi de 28-32°C și pH acid favorizează multiplicarea drojdiilor și a bacteriilor lactice. Multiplicarea celulelor de drojdie depinde de temperatura și consistența maiei. Astfel, la temperaturi mai mari de 32°C viteza de înmulțire a drojdiei se reduce, iar dacă consistența maiei este mare se poate produce o inhibare a multiplicării. Aerarea maielelor activează înmulțirea celulelor de drojdie și capacitatea de a forma CO₂, gaz care se dezvoltă în corelație directă cu numărul de celule vii de drojdie. În maia și aluat între drojdiile și diferitele specii de bacterii lactice pot să apară relații de concurență, metabioză și anabioză. Drojdiile favorizează dezvoltarea bacteriilor lactice prin punerea la dispoziție a vitaminelor – factori de creștere pentru bacterii. Prin folosirea oxigenului în aluat sunt create condiții de anaerobioză; la rândul lor bacteriile lactice produc acizi care mențin în aluat un pH acid ce favorizează desfășurarea normală a fermentației alcoolice a zaharurilor din făină sau formate prin activitatea enzimelor amilolitice ale făinii.

Fermentarea reprezintă faza din procesul tehnologic cu ponderea cea mai mare din timpul destinat fabricării pâinii și se produce în aluat în timpul divizării, modelării, dospirii bucăților de aluat modelate și chiar în prima perioadă a procesului de coacere.

În aluat, celulele de drojdie și bacterii lactice au o viteză de multiplicare mult mai redusă datorită conținutului redus în apă liberă, a gradului redus de aerare, a conținutului în celule mai redus decât în maia, în schimb acestea desfășoară o activitate metabolică normală și în funcție de echipamentul lor enzimatic propriu, produc fermentarea specifică a surselor hidrocarbonate asimilabile.

Celula de drojdie absoarbe ușor hexozele care trec prin membrana citoplasmatică celulară prin difuziune simplă în cazul în care există un gradient de concentrație între concentrația lor în exteriorul celulei și cea din interior. Transportul activ se poate realiza și prin translocăție de grup a esterilor fosforici ai hexozelor prin intermediul hexokinazelor.

Printre hidrații de carbon existenți în aluat sau formați în urma hidrolizei amidonului sub acțiunea alpha și beta-amilazei prezente în făină (sau din surse exogene), există o diferență în secvența de absorbție și fermentare. Astfel, cel mai rapid sunt absorbite hexozele (glucoza), apoi zaharoza și maltoza.

Zaharoza este hidrolizată în exteriorul membranei citoplasmatică, în regiunea peretelui celular unde este localizată invertaza (β D-fructofuranozid-fructohidrolaza) și este absorbită cu o viteză echivalentă cu cea a hexozelor din care este formată, respectiv glucoza și fructoza, zaharuri direct fermentescibile.

Fermentarea succesivă se explică prin adaptarea treptată a celulei prin inducerea enzimelor adaptive, pe măsură ce în mediu se formează maltoză.

D-maltoza – principalul dizaharid prezent în aluat este fermentat numai după o perioadă de inducție necesară pentru formarea enzimei maltaza (alpha D glucozid glucohidrolaza).

Maltoza și maltotrioza pătrund în celula de drojdie sub influența unor permeaze specifice induse în prezența lor, enzime care se comportă ca sisteme active de transport. După pătrunderea în interiorul celulei sub acțiunea α -glucozidazei induse este hidrolizată în glucoză (2 moli) și are loc fermentarea rapidă.

Ca rezultat al fermentației alcoolice, are loc o creștere în volum a aluatului, datorită dioxidului de carbon format și reținut de gluten, iar produsele secundare ale fermentației alcoolice participă la formarea gustului și aromei pâinii.

Defecte și boli ale pâinii produse de microorganisme

Mucegăirea. Este unul dintre cele mai frecvente defecte de natură microbiologică, întâlnite în industria panificației. Se apreciază că aproximativ 1-5 % din producția de pâine, se alterează datorită activității fungilor. În cazul pâinii contaminarea cu mucegaiuri determină nu numai modificări ale culorii, gustului, ci și pierderi ale calității de aliment, ca rezultat al formării posibile de micotoxine.

Mucegăirea este datorată contaminării externe a pâinii după coacere, deoarece sporii existenți în făină, în timpul unui proces tehnologic normal nu au condiții de multiplicare, iar în timpul coacerii, aceștia sunt distruși.

Contaminarea cu mucegaiuri a pâinii, se poate produce în următoarele etape:

- la transportul pâinii;
- la răcire și depozitare;
- în timpul tăierii și ambalării (operații facultative).

Propagarea sporilor de mucegai și contaminarea pâinii poate avea loc indirect, pe calea aerului din sala de depozitare (prin aer) sau direct, prin contact cu lădițe, navete, mijloace de transport etc.

Dintre mucegaiurile care contaminatează pâinea în timpul păstrării, se întâlnesc frecvent următoarele specii și genuri: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum candidum*, *Mucor*, *Neurospora sitophila*, *Penicillium*, *Rhizopus stolonifer*, *Thamnidium elegans*.

Prin dezvoltarea altor mucegaiuri se produc pigmentări superficiale, care nu afectează decât aspectul comercial al pâinii. Astfel prin dezvoltarea lui *Geotrichum auranticum* și *Thamnidium auranticum*, are loc o colorare în roșu-auriu a pâinii în zona de dezvoltare a coloniilor.

Defectul de pâine cretoasă. Este produs prin dezvoltarea pe suprafața pâinii a lui *Monilia variabilis*, care formează pete cu un aspect făinos, pulverulent; acest defect este mai frecvent la pâinea obținută cu făină de secară.

Un alt aspect nedorit al mucegăirii, îl constituie posibilitatea dezvoltării mucegaiurilor producătoare de micotoxine ca: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum*, *Penicillium viridicatum*.

Defecte ale pâinii produse de către drojdii. Drojdiile pot produce rar, defecte ale aspectului și gustului pâinii, contaminate după coacere, în condițiile în care umezeala relativă a aerului este mai mare de 90%. Drojdiile din genul *Endomycopsis* pot produce pete pe suprafața și în interiorul pâinii. Datorită enzimelor amilolitice pe care le conțin, are loc o hidroliză parțială a amidonului, cu formare de dextrine și glucoză. Pe pâine se mai pot dezvolta și drojdiile din genul *Rhodotorula*, care formează colonii colorate în roșu, dând defectul de culoare, fără însă a produce modificări în compoziția pâinii.

Defecte și boli ale pâinii produse de bacterii. Bacteriile pot produce defecte și boli ale pâinii, în condițiile unui proces tehnologic defectuos, dacă nu sunt respectate condițiile igienico-sanitare. Ca și mucegaiurile, bacteriile pot proveni prin contaminare indirectă și directă. Dezvoltarea și multiplicarea bacteriilor este favorizată de umiditatea mare a miezului și de temperaturi în intervalul 25-40°C.

Cele mai importante alterări ale pâinii produse de bacterii sunt defectele de culoare și boala întinderii.

Defecte de culoare. În timpul verii, când pâinea este păstrată la temperaturi de 20-30°C, pot apare pete de culoare roșie datorită multiplicării lui *Chromobacterium prodigiosum*. Această bacterie secretă un pigment de culoare roșie, prodigiosina și se dezvoltă optim la 25°C.

Pâinea se poate pigmenta și prin dezvoltarea lui *Chromobacterium cyanogenum*, care elaborează în pâine un pigment de culoare albastră sau violetă.

Bacteriile care dau defecte de culoare nu sunt componente ale microbiotei normale a făinii, acestea ajungând prin contaminare, de pe utilaje și din aer.

Boala întinderii. Este apreciată a fi cea mai importantă boală a pâinii, provocată de bacterii. Agenții microbieni producători ai bolii, sunt incluși în grupul *Bacillus* din care fac parte următoarele specii: *B.mesentericus*, *B.subtilis* și *B.licheniformis*.

Aceste bacterii fac parte din microbiota cerealelor și trec în făină prin procesul de măcinare; în cazul loturilor de cereale care au suferit încingerea, numărul bacteriilor sporulate care ajung în făină, este mărit. Bacteriile se caracterizează prin formarea endosporilor de tip bacillus, termorezistenți, care își păstrează viabilitatea în procesul de coacere al pâinii. Prin sterilizarea unui mediu care conține bacterii sporulate, la temperatura de 100°C, este necesar un timp de 5,5-6 ore. Deoarece temperatura maximă care se obține în timpul coacerii în interiorul pâinii este de ~98°C pe o durată de câteva minute, sporiile bacterieni nu sunt distruși și după coacere pot trece în forma vegetativă, se multiplică, producând alterarea pâinii. Bacteriile pot forma un pigment roz-cenușiu; au un pigment roz-cenușiu; au un bogat echipament enzimatic și pot să producă o hidroliză avansată a proteinelor și amidonului.

Boala întinderii se întâlnește mai frecvent la pâinea albă, în timpul verii. După păstrarea pâinii proaspete 24-48 ore, prin ruperea pâinii se simte un miros caracteristic de pepene galben, miere sau de valeriană. Miezul pâinii este lipicios și la rupere se întinde în fire și din acest motiv această alterare a primit denumirea de

„boală a întinderii”. Pe măsura dezvoltării bolii, mirosul se intensifică, devine putrid, iar miezul este cleios, își pierde structura poroasă și apar goluri și rupturi. Toate aceste modificări sunt datorate activității metabolice a bacteriilor sporogene, care își procură astfel substanțele nutritive și energia necesară creșterii și multiplicării lor.

Degradarea structurii normale a miezului se produce ca rezultat al capacității acestor bacterii de a hidroliza amidonul gelificat, până la dextrine și glucide fermentescibile. Cantitatea de amidon, într-o pâine cu boala întinderii poate să scadă de la 63% cât conține o pâine normală, până la valori de 16%. *Bacillus subtilis* posedă enzime proteolitice de tipul papainei, dipeptidaze și polipeptidaze, care pot să producă o hidroliză avansată a protidelor din miez, ceea ce determină formarea firelor la ruperea pâinii.

20.4. PROCESE MICROBIOLOGICE LA FABRICAREA PASTELOR FĂINOASE

Pastele făinoase se prepară din făină, apă, sare și alte materii care se adaugă în vederea măririi valorii nutritive a pastelor, deoarece produsele de măcinăș utilizate la fabricarea lor sunt lipsite de unii aminoacizi esențiali ca triptofanul, lizina, valina și treonina, aminoacizi care se găsesc în exces în protidele de origine animală. În procesul tehnologic, microorganismele aflate în făină și cele din apă, sare, ingrediente, pot găsi condiții de dezvoltare în timpul frământării, presării și în primele etape ale procesului de uscare. La operația de presare granulele de amidon ale făinii își pierd parțial integritatea și sunt mai ușor hidrolizate sub acțiunea enzimelor microbiene. Amidonul și substanțele proteice ale făinii, datorită proprietăților higroscopice, leagă apa coloidal, încât aluatul de paste are o umiditate de 27-33%. La aceste valori ale umidității, în cazul întreruperii accidentale a fluxului tehnologic normal, există condiții de multiplicare a microorganismelor.

Uscarea pastelor făinoase reprezintă faza finală a procesului. Ca urmare a temperaturilor de maximum 50°C atinse la uscare, microorganismele existente nu sunt distruse, acestea trec într-o stare de anabioză. La sfârșitul uscării pastele trebuie să aibă umiditatea de 12% care le asigură conservarea un timp îndelungat. La depozitare, între umezeala relativă a aerului și pastele făinoase se stabilește o umiditate de echilibru; în condițiile în care umiditatea în paste crește peste 14-15%, microorganismele existente pe produs, pot să se dezvolte activ, dând alterări ale pastelor făinoase.

În afară de microorganismele componente ale microbiotei materiilor prime și auxiliare folosite în rețeta de fabricație a pastelor făinoase și care reprezintă ponderea cea mai ridicată, o sursă suplimentară o poate constitui aerul, utilajele, personalul.

Printre defectele de natură microbiologică care au loc la fabricarea pastelor făinoase, cel mai frecvent este acrirea pastelor, ca rezultat al multiplicării bacteriilor lactice care fermentează glucidele din făină cu formarea de acid lactic, produse secundare. În unele cazuri, acrirea pastelor este asociată cu apariția pe suprafața lor a unor bașicuțe de gaz, care diferă ca repartizare, dimensiuni și densitate pe suprafață; prin spargerea lor, în masa de aluat rămân alveole.

În urma controlului microbiologic al macaroanelor cu ouă, în afară de bacterii organotrofe, au fost prezente bacterii producătoare de toxine. Astfel s-au identificat specii de *Staphylococcus aureus* și din genul *Salmonella*, în cantități de 10^2 - 10^6 ufc/g.

Mucegăirea pastelor făinoase poate avea loc în mod accidental la uscare, în cazul unor întreruperi ale procesului tehnologic, favorizată de umezeala relativă ridicată de 85-90% existentă în dulapurile de uscare, când temperatura nu depășește

valori de 45°C. mucegăirea se mai pot produce și în timpul depozitării, când umiditatea pastelor crește peste 14-15%. În paste au fost depistate peste 79 de specii de mucegaiuri, reprezentante ale genurilor: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Spicaria*. Dintre speciile izolate, în urma testării, lor, două specii aparținând lui *Aspergillus flavus*, au produs aflatoxine.

20.5. PROCESE MICROBIOLOGICE LA FABRICAREA BISCUIȚILOR

La fabricarea biscuiților, deși microbiota aluatului este deosebit de variată, datorită procesului de coacere la temperaturi ridicate și dimensiunile reduse ale biscuiților are loc distrugerea tuturor microorganismelor prezente în aluat.

Unul din principalele defecte de natură microbiologică care se poate întâlni la fabricarea biscuiților, este apariția în produsul finit, imediat după preparare, sau în timpul depozitării, a unui gust neplăcut de „săpun”, dacă grăsimea animală sau vegetală utilizată la obținerea lor a suferit în prealabil o mucegăire.

21. MICROBIOLOGIA FRUCTELOR

Microbiologia fructelor este eterogenă și variază cantitativ, în funcție de soi, dimensiuni, structura anatomică, grad de coacere și condiții de recoltare, transport și conservare. Fructele se consumă în stare proaspătă, de aceea ele pot fi vehiculante a unor microorganisme facultativ patogene, astfel încât din punct de vedere microbiologic este important ca înainte de consum să se facă spălarea lor cu apă potabilă. În cazul epidemiilor se recomandă dezinfectarea fructelor pentru distrugerea patogenilor și apoi clătirea cu apă fiartă și răcită.

În microbiota fructelor apar accidental microorganisme patogene și facultativ patogene: *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, bacterii care produc îmbolnăviri/toxiinfecții alimentare. Prin intermediul fructelor se poate transmite *Helicobacter pylori* bacterie mobilă adaptată la aciditatea sucului gastric, care colonizează omul și animalele, fiind agent al gastritelor și enteritelor.

Se pot dezvolta pe fructe mucegaiuri organotrofe comune sau care produc micotoxine (g. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichothecium*).

Rezistența fructelor la păstrare depinde de numeroși factori: structura anatomică a fructelor, substanțe de protecție cu efect antimicrobian (acizii organici), substanțele fitoncide (prezente în fructe) acționează cu efect letal asupra unor microorganisme – uleiuri eterice.

Cea mai răspândită formă de alterare a fructelor este putrezirea provocată de dezvoltarea și activitatea mucegaiurilor. Fructele și în special sucurile lor prezintă un mediu favorabil pentru acțiunea microorganismelor.

Dintre microorganismele care produc alterări ale fructelor fac parte:

- **bacteriile** – au un rol minor în alterarea fructelor deoarece nu pot acționa asupra fructului intact sau nu au condiții de dezvoltare la pH acid. Atunci când fructele sunt zdrobite se pot dezvolta ocazional bacterii acidotolerante (lactice) și bacterii acetice, care se dezvoltă în asociație cu drojdiile, de la care se folosesc factorii de creștere sau produsele lor de catabolism,
- **drojdiile** – sunt foarte răspândite în microbiota epifită a fructelor și produc alterări când vin în contact cu sucul dulce. Activitatea lor se manifestă prin fermentația alcoolică a glucidelor și prin înmuiere datorată enzimelor pectolitice. Se dezvoltă uneori după putrezirea dată de mucegaiuri sau în zone lezate ale fructelor. Drojdiile din genul *Rhodotorula* și *Sporobolomyces* se caracterizează prin formarea

unor pigmenți roșii; specii ale genurilor *Candida*, *Hansenula*, *Kloeckera* și *Torulopsis* în asociație cu specii de *Saccharomyces* și *Schizosaccharomyces* folosesc ca sursă de carbon, acidul malic, care le permite dezvoltarea de fructe acide;

- **mușegaiurile** – pot produce alterări atât în perioada de creștere și maturizare a fructelor cât și în timpul păstrării lor în stare proaspătă. Dintre genurile des întâlnite fac parte g. *Alternaria* – produce alterarea fructelor dulci și putrezirea brună; g. *Aspergillus* – se dezvoltă pe fructe foarte dulci sau cu umiditate scăzută; specia *Botrytis cinerea* – dă putrezirea umedă cenușie a fructelor dulci (struguri, căpșuni, cireșe) ca urmare a activității pectolitice le transformă într-o masă mucilaginoasă terciuită; g. *Cladosporium* – produce mușegăirea pepenilor formând pete de culoare brun-negru și putrezirea uscată a altor fructe dulci; g. *Mucor* și g. *Rhizopus* dau putrezirea acidă și umedă, se dezvoltă pe fructe cu umiditatea mare chiar și la temperaturi de refrigerare (detectarea lui *Mucor* în alimente este un indiciu de nerespectare a igienei sau că materia primă este de calitate inferioară); g. *Penicillium* – speciile acestui gen dau putrezirea verde (umedă) sunt foarte răspândite și se dezvoltă pe cireșe, caise, vișine, mere, pere, fructe citrice; g. *Trichoderma* – formează colonii de culoare verzuie și dă putrezirea umedă și înmuierea fructelor ca urmare a elaborării active de celuloze. Odată ce scăderea calităților senzoriale, în cazul alterărilor fungice fructele își pierd și valoarea alimentară datorită riscului potențial al unor mușegaiuri de a produce micotoxine extracelulare, încât îndepărtarea numai a părții alterate vizibil, nu este suficientă de a elimina riscul de intoxicație. În cazul fructelor citrice mușegăite cu specii toxicogene de *Aspergillus* au fost identificate în suc, aflatoxinele B₁ și G₁ (la portocale) și sterigmatocistine (la grefe).

22. MICROBIOLOGIA SUCURILOR ȘI A BĂUTURILOR RĂCORITOARE

De pe suprafața fructelor în procesul tehnologic de extracție, microorganismele trec în suc. Sucurile de fructe și băuturile răcoritoare au pH redus și conțin cantități apreciabile de glucide, încât devin medii selective favorabile pentru creșterea drojdiilor. Stabilitatea biologică a sucurilor de fructe este influențată de:

- intensitatea contaminării inițiale a sucurilor care se reflectă în cantitatea și natura microorganismelor prezente în suc după ambalare;
- compoziția chimică a sucului, respectiv de conținutul de glucide, combinații asimilabile de azot, substanțe minerale, vitamine, valoare pH, rH;
- diferiți factori de producție pot cauza distrugerea sau îndepărtarea microorganismelor, ca de exemplu: pasteurizarea, sterilizarea, blanșarea, turnarea la cald, filtrarea sterilizantă, adăugarea de conservanți;
- temperatura de păstrare; în domeniul temperaturilor de refrigerare se reduce viteza de creștere și înmulțire a microorganismelor, prelungindu-se perioada de păstrare;
- rezistența microorganismelor prezente în suc la aciditatea naturală, sensibilitatea la alți factori restrictivi.

Alterări microbiene ale sucurilor de fructe

Drojdi. Sunt produse alterări în proporție de 90% de către drojdiile care se dezvoltă până la valori de pH = 2,5 cu o creștere încetinită de la valori de pH < 3.

În sucuri concentrate de portocale se întâlnesc frecvent specii ale genului *Torulopsis*.

Mucegaiuri. Mucegăirea este posibilă dacă există gol de aer și este produsă de specii ale genurilor *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phyalophora* etc. Mucegaiurile pot forma o peliculă la suprafața sucurilor și pot elibera substanțe colorate sau să degradeze pigmenții naturali ai sucului.

Bacterii. Ocazional se întâlnesc și alterări datorate bacteriilor lactice din genul *Lactobacillus* și *Leuconostoc*. În sucuri de citrice bacteriilor lactice încep să fie inhibate la pH = 4.

Alterarea microbiană a băuturilor răcoritoare

Sucurile de fructe se folosesc și la obținerea băuturilor răcoritoare (nealcoolice), care se conservă ca urmare a unui pH scăzut și a concentrației de dioxid de carbon. Alterările sunt date de drojdii și bacterii care pot proveni din zahăr sau din microbiota sucurilor.

Pentru obținerea unor băuturi de calitate este necesară respectarea procesului tehnologic și asigurarea condițiilor de igienă cu efectuarea unui control microbiologic sistematic.

Băuturile răcoritoare pot fi un mediu nutritiv pentru microorganisme deoarece conțin 0,5-15% zahăr, acizi organici, cantități infime de azot organic, săruri minerale.

Microorganismele agenți de alterare a acestor băuturi pot fi arbitrar împărțite astfel:

- microorganisme care produc modificarea însușirilor senzoriale în care intră:
 - o drojdii din genurile *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*;
 - o bacteriile lactice – produc transformarea acidului malic în acid lactic și dioxid de carbon ceea ce duce la reducerea acidității și stabilității;
- microorganismele care produc modificări ale aspectului și a gustului, în băuturi necarbonatate din care fac parte mucegaiuri din genul *Aspergillus*, genul *Penicillium*, iar dintre bacterii, bacterii acetice din genurile *Acetobacter* și *Acetomonas*. Aceste bacterii se pot dezvolta în băuturi cu potențial de oxidoreducere ridicat și sunt inhibate de prezența dioxidului de carbon, dar pot fi rezistente la unii conservanți, ca de exemplu la acidul sorbic și acidul benzoic. Înmulțirea bacteriilor acetice denotă o spălare insuficientă, o umplere incompletă a sticlelor și capsule cu defecte de etanșeitate;
- microorganisme care nu produc modificări senzoriale dar prezintă risc pentru sănătatea consumatorilor, în care sunt incluse bacterii agenți ai toxiinfecțiilor și intoxicațiilor alimentare.

23. MICROBIOLOGIA LEGUMELOR

Microbiologia legumelor proaspete

Legumele au o microbiotă foarte bogată deoarece, în funcție de natura lor, vin în contact cu solul și pot avea între 10^2 - 10^7 ufc/g. Un grad ridicat de contaminare este întâlnit la legume verzi (salate, spanac, ceapă, varză) contaminate prin microorganisme provenite din praf, ape de irigație, apă de ploaie, în care frecvent se întâlnesc bacterii: *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* și spori de mucegaiuri. Pe foi de varză, în zona centrală, se pot găsi bacterii lactice în concentrații de aproximativ 10^3 /cm².

În cazul irigării solului cu ape poluate, prin legume consumate în stare proaspătă se pot transmite microorganisme patogene și facultativ patogene: *Escherichia*, *Salmonella* (în 25-75% din probe de salată), *Shigella*, *Klebsiela*.

Dintre bacteriile agenți ai toxiinfecțiilor alimentare, pe legume se pot întâlni *Bacillus cereus* și *Bacillus thuringiensis* ce poate fi folosit în calitate de insecticid biologic, care rezistă pe suprafața plantelor, pot supraviețui la prelucrările tehnologice și prin înmulțire la concentrații de $10^9/g$, pot produce toxiinfecții alimentare.

Microorganismele patogene pot să provină și din contaminarea secundară în timpul prelucrării manuale sau prin intermediul aparatului (la tăiere, tocare, răzuire etc.) dacă nu se respectă condițiile igienice. Contaminarea este mai rapidă când țesutul protector este degradat la recoltare, transport sau prin intermediul insectelor.

Legumele prezintă o compoziție valoroasă și sisteme de protecție față de atacul microbial. Astfel prezintă o cuticulă de protecție de natură celulozică, unele legume conțin substanțe fitoncice: ridichea – sulforaphen, ceapa – alicină, hreanul – substanțe volatile care inhibă creșterea lui *Bacillus subtilis* și *Escherichia coli*. Unele legume, rădăcinoase pot elabora fitoalexine, substanțe cu activitate antibiotică sintetizate ca o reacție la prezența agenților de infecție. În timpul păstrării, legumele comparativ cu fructele, sunt mai puțin protejate, deoarece au un pH apropiat de neutru, convenabil dezvoltării majorității microorganismelor.

Alterări microbiene ale legumelor

Putrezirea legumelor poate fi cauzată de bacterii și mucegaiuri, în timp ce bacteriile au un rol minor.

Bacterii din sol și apă

Cartofii pot fi alterați de bacterii din genul *Pseudomonas*, care se pot dezvolta pătrunzând prin leziuni ale cojii. Bacteriile filamentoase din genul *Actinomyces* hidrolizează celuloza și amidonul. Alterarea bacteriană se produce atunci când bacteriile au acces direct la substanțele nutritive și legumele au umiditate mare; în alte condiții alterarea microbială este de natură fungică.

Mucegaiuri. Sunt agenții cei mai periculoși la păstrarea legumelor, având condiții bune de dezvoltare. Ei sunt agenți ai putrezirii albe, negre și cenușii în funcție de modificarea specifică a culorii.

Dintre mucegaiurile întâlnite frecvent fac parte:

- *Alternaria* produce putrezirea neagră și umedă;
- *Fusarium* produce putrezirea umedă la mazăre, fasole, castraveți, tomate, cartofi; se dezvoltă formând un miceliu păslos și are loc înmuierea legumelor;
- *Peronospora* dă putrezirea uscată la diferite legume; peronospora brassicae dă pete la varză;
- *Rhizopus* și *Mucor* dau mucegăirea tomatelor coapte și putrezirea umedă;
- *Rhizoctonia* dă putrezirea brună caracterizată prin apariția unor pete de culoare brun-negru la morcovi, sparanghel, varză, țelină. La început apare un miceliu violet, apoi degradarea are loc în profunzimea țesutului.

Procese microbiologice la murarea legumelor

Numeroase legume (peste 20) sunt conservate prin murare, dar importanță comercială o au varza, castraveții și măslinile. Fermentația lactică prezintă câteva avantaje majore, deoarece nu necesită consum de energie aducând un aport nutrițional valoros datorat bacteriilor lactice și prelungeste perioada de conservare a legumelor.

Murarea verzii are loc în mai multe etape diferențiate din punct de vedere microbiologic. În primele zile sunt active numeroase microorganisme aerobe ce consumă oxigenul dizolvat. Dintre acestea, specii de *Pseudomonas* și *Flavobacterium rhenanum* produc colorarea în gălbui a zemii. Sub acțiunea

microbiotei eterogene alcătuită din microorganisme aerobe (drojdii, mucegaiuri, bacterii: *Pseudomonas*, *Enterobacter* se formează gaze (CO_2 , H_2 și chiar urme de CH_4) și acizi: mici cantități de acid lactic, acid fumaric, acetic, succinic, care se combină cu alcoolii produși de drojdii, rezultând compuși care contribuie la formarea gustului și aromei. În a doua fază este inhibată microbiota aerobă și se dezvoltă bacterii din genul *Leuconostoc*, bacterii facultativ anaerobe, care produc fermentarea zahărului cu formare de acid lactic, în cantități mici acid acetic, alcool etilic și dioxid de carbon, manitol, esteri, compuși de aromă ca alcool izoamilic, n-hexanol, esterul etil-lactic etc.; la acumularea de 1% acid lactic dezvoltarea lui *Leuconostoc* este inhibată. Primele două stadii se termină în aproximativ 3-6 zile. Bacteriile din g. *Pseudomonas* și *Escherichia* dispar în 1-2 zile și sunt înlocuite de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* și *Pediococcus rhamnosus*. Faza a treia are rolul cel mai important deoarece se formează intens acidul lactic prin fermentația homolactică produsă de *Lactobacillus plantarum* rezistent la concentrații mari de sare, cu temperatura optimă de fermentare la 18-20°C. Uneori pot fi prezente și drojdii osmotolerante din g. *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* care produc alcool etilic, acid acetic, CO_2 . Ca rezultat al activității microbiene zeama dobândește valoare terapeutică fiind o sursă de vitamine produsă de bacteriile lactice/drojdii. Faza poate dura 3 săptămâni și se acumulează acid lactic în concentrații de 1,5-2% care inhibă activitatea fermentativă a lui *Lactobacillus plantarum*. În stadiul IV, glucidele reziduale pot fi fermentate cu formare de acid lactic, acid acetic, alcool, manitol și CO_2 de către bacterii heterolactice din genul *Lactobacillus brevis*, care fermentează pentoze ducând la acumularea de produși de gust și aromă. În condiții naturale la murare, nu se pot acumula cantități mai mari de 2,5 g% acid lactic deoarece este inhibată activitatea fermentativă a bacteriilor lactice. Conservarea are loc datorită acidului lactic și epuizării substanțelor nutritive. În medie, în varza murată raportul între acid lactic și acidul acetic este de 1:4 la un pH de 3,4-3,8 cu formarea de până la 0,25% a compușilor secundari de fermentație.

Defecte și alterări ale verzei murate

Gustul amar se produce atunci când murarea se realizează la temperaturi mai scăzute datorat activității bacteriilor psihrofile.

Înmuierea verzei după murare este datorată activității enzimelor microbiene sau a enzimelor tisulare ale verzei, mai ales în prezența aerului, în saramuri cu concentrația sub 0,8% sare care a fost supusă la variații mari de temperatură.

Zeama filantă, este datorată formării de dextran prin dezvoltarea în exces a lui *Leuconostoc mesenteroides*, dar și ca rezultat al dezvoltării drojdiilor *Hansenula anomala*, *Candida mycoderma* și a mucegaiului *Geotrycum candidum*, consumatoare de acid lactic. În acest caz aciditatea scade treptat, este favorizată dezvoltarea bacteriilor de putrefacție și se produce alterarea zemii.

Murarea castraveților. Castraveții pentru murare trebuie prelucrați imediat după recoltare sau cel mult după 6-8 ore, deoarece alterarea lor se poate realiza rapid. Concentrația saramurii trebuie să fie de 1-15% deoarece castraveții au un conținut de aproximativ 90% apă, care prin difuzie va produce în timp diluarea saramurii inițiale. Concentrația de sare inițială poate să inhibe dezvoltarea bacteriilor lactice și de aceea poate fi mărită după 5-6 săptămâni.

În cazul murării castraveților se pot diferenția trei etape:

- fermentația inițială produsă de *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus cerevisiae*, fiind faza cea mai importantă de murare. În această

perioadă se multiplică rapid bacteriile lactice și drojdiile, în timp ce microorganismele ne semnificative se reduc sau chiar pot să dispară;

- fermentația intermediară care durează 3-6 săptămâni asigură condiții optime de fermentare pentru microbiota lactică și are loc o stabilizare a saramurii;
- în faza finală, *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* și *Lactobacillus brevis* sunt responsabile pentru formarea în final de 1-1,5% acid lactic. Prezența în exces a lui *Lactobacillus brevis* nu este dorită, ca urmare a formării de gaze prin fermentație.

Alterarea castraveților murați.

Înmuierea este datorată activității enzimelor pectolitice (pectinaze și poligalacturonaze) elaborate de mucegaiurile care se dezvoltă în prezența aerului: *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* etc.

Formarea de gaze și umflarea este datorată bacteriilor heterolactice care produc prin fermentarea glucidelor cantități mari de CO₂ și H₂ (g. *Enterobacter*) sau care degradează acidul malic cu formare de acid lactic și CO₂ (g. *Leuconostoc*). Formarea de gaze în țesut mai poate fi datorată activității fermentative a drojdiilor. Din saramura de castraveți murați au fost izolate numeroase drojdii: *Brettanomyces versatilis*, *Hansenula subpelliculosa*, *Torulopsis caroliniana*. Aceste drojdii au fost izolate din saramuri cu 4-18% sare și pH-ul variind între 3,1-4,8.

Murarea măslinelor

Măslinile verzi sunt inițial imersate în soluție de NaOH 1-2 % timp de 6 ore pentru eliminarea gustului amar dat de glucozidul europeană după care se efectuează o spălare timp de 8 ore cu apă potabilă, operație prin care se detașează și se elimină o mare cantitate din microbiota epifită. Măslinile sunt apoi imersate în saramură de concentrație 4-10% timp de 6-7 luni în care glucidele, aminoacizii eliberați prin osmoză sunt fermentate în mod gradat.

Din punct de vedere microbiologic se disting 3 faze:

- prima etapă durează 7-14 zile perioadă în care predomină bacterii din genurile *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Leuconostoc mesenteroides*. Dacă fermentația are un curs normal bacteriile potențiale de a produce alterarea sunt rapid eliminate ca urmare a dezvoltării bacteriilor lactice ce aparțin genurilor *Streptococcus*, *Pediococcus* și *Leuconostoc*. În anumite condiții microorganismele de alterare devin predominante;
- faza intermediară în care predomină bacteriile lactice are o durată de 2-3 luni. Cantitativ pe primul loc se situează *Leuconostoc mesenteroides* urmat de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*;
- faza finală care durează câteva luni se caracterizează prin predominanța bacteriilor lactice ale genului *Lactobacillus* care produc acid lactic și are loc o scădere a pH-ului sub 4.

Pentru obținerea măslinelor negre se aplică tratarea succesivă cu NaOH 1-1,5% în trei trepte intercalate cu perioade de păstrare în apă, cu barbotare de aer, pentru a favoriza prin procese de oxidare formarea culorii negre (dată de un polimer format din ortofenoli, hidroxitirizol și acidul cafeic).

Defecte al măslinelor la murare

- degradarea pectinolică în urma dezvoltării de microorganisme producătoare de endo și exopoligalaturonaze (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*);
- formarea de pustule cu gaz la suprafața măslinelor (ochi de pește) datorate dezvoltării excesive a bacteriilor coliforme sau a bacteriilor butirice, posibilă atunci când saramura aer sub 5% sare, iar pH-ul este mai mare de 4,8,

- modificări de gust datorate formării de acizi: propionic, butiric, valerianic, caproic, ca urmare a dezvoltării de bacterii ale genului *Propionibacterium* și *Clostridium*.