



UNIUNEA EUROPEANĂ



IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești

Proiect cofinanțat din Fondul Social European Operațional Capital Uman 2014-2020

TEZĂ DE DOCTORAT

Proiectarea de ingrediente noi bazate pe compuși bioactivi din vinete pentru diferite aplicații în industria alimentară

(Rezumat)

Doctorand,

Nina-Nicoleta CONDURACHE (LAZĂR)

Conducător științific,

Prof. dr. ing. habil. Gabriela RÂPEANU

Lucrare realizată în cadrul proiectului „Program pentru creșterea performanței și inovării în cercetarea doctorală și postdoctorală de excelență - PROINVENT”
Contract nr: 62487/03.06.2022 POCU/993/6/13 - Cod SMIS: 153299

Seria I.7. Ingineria produselor alimentare Nr. 18

GALAȚI

2023



Parteneri:



„Program pentru creșterea performanței și inovării în cercetarea doctorală și postdoctorală de
exelență - PROINVENT”

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI Școala doctorală de
Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT

Proiectarea de ingrediente noi bazate pe compuși bioactivi din vinete pentru diferite aplicații în
industria alimentară

Doctorand,

Nina-Nicoleta CONDURACHE (LAZĂR)

Președinte comisie
Coordonator științific

Prof. dr. ing. Gabriela-Elena BHRIM
Prof. dr. ing. Gabriela RÂPEANU

Referenți științifici

Prof. dr. Zuzana CIESAROVA
Prof. dr. ing. Mircea Adrian OROIAN
Prof. dr. ing. Nicoleta STĂNCIUC

Seria I.7. Ingineria produselor alimentare Nr. 18

GALAȚI

2023



Parteneri:



Seriile tezelor de doctorat susținute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunt:

Domeniul fundamental ȘTIINȚE INGINEREȘTI

- Seria I 1: **Biotehnologii**
- Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**
- Seria I 3: **Inginerie electrică**
- Seria I 4: **Inginerie industrială**
- Seria I 5: **Ingineria materialelor**
- Seria I 6: **Inginerie mecanică**
- Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**
- Seria I 8: **Ingineria sistemelor**
- Seria I 9: **Inginerie și management în agricultură și dezvoltare rurală**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE SOCIALE

- Seria E 1: **Economie**
- Seria E 2: **Management**
- Seria E 3: **Marketing**
- Seria SSEF: **Știința sportului și educației fizice**
- Seria SJ: **Drept**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE UMANISTE

- Seria U 1: **Filologie- Engleză**
- Seria U 2: **Filologie- Română**
- Seria U 3: **Istorie**
- Seria U 4: **Filologie - Franceză**

Domeniul fundamental MATEMATICĂ ȘI ȘTIINȚE ALE NATURII

- Seria C: **Chimie**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE BIOMEDICALE

- Seria M: **Medicină**
- Seria F: **Farmacie**

Mulțumiri

Sunt onorată să-mi exprim recunoștința tuturor celor care m-au îndrumat și sprijinit pe parcursul dezvoltării tezei de doctorat.

În primul rând, aș dori să mulțumesc doamnei **prof. dr. ing. Gabriela RÂPEANU** pentru timpul acordat, sfaturile și îndrumările oferite în dezvoltarea tezei mele în calitate de profesor coordonator.

Sunt recunoscătoare membrilor comisiei de îndrumare pentru sfaturile, sprijinul și sugestiile oferite. Îmi exprim recunoștința doamnei **prof. dr. ing. Gabriela BHRIM**, pentru oportunitatea oferită de a mă alătura echipei de cercetare a proiectului PRO-SPER. Recunoștința mea merge și către doamna **prof. dr. ing. Nicoleta STĂNCIUC** pentru sprijinul acordat în laborator. Nu în ultimul rând, mulțumiri speciale doamnei **prof. dr. ing. Iuliana APRODU**, pentru îndrumarea și cuvintele frumoase spuse la momentul potrivit, chiar și atunci când bariera științifică a fost depășită.

Mulțumiri speciale distinșilor referenți oficiali, **prof. dr. Zuzana CIESAROVA** și **prof. dr. ing. Mircea Adrian OROIAN**, pentru onoarea acordată de a revizui această lucrare și de a fi prezenți la susținerea publică a tezei de doctorat.

Mulțumesc tuturor colegilor mei care m-au susținut pe parcursul pregătirii doctorale. Îmi exprim recunoștința de nenumărate ori tuturor, dar în special doamnelor **dr. ecol. Elena ENACHI**, **dr. ing. Mihaela COTĂRLEȚ**, **dr. ing. Carmen BOLEA**, **lect. dr. ing. Georgiana HORINCAR**, și nu în ultimul rând, **dr. ing. Ștefania Adelina MILEA** cu care am împărtășit râsete și plânsete, micropipete, și analize de laborator.

Vă mulțumesc tuturor pentru că ați fost dispuși să împărtășiți cu mine bogatele dumneavoastră cunoștințe acumulate de-a lungul anilor de studiu și muncă!

Teza de doctorat a fost realizată în cadrul proiectului „**Program de creștere a performanței și inovației în cercetarea doctorală și postdoctorală de excelență – PROINVENT**” contract nr. 62487/06.03.2022, POCU/993/6/13 - Cod SMIS: 153299. Doresc să-mi exprim recunoștința și echipei de management a proiectului pentru că mi-a oferit șansa de a mă alătura grupului țintă de participanți.

Deosebite aprecieri adresez **soțului meu Alin** și **familiei mele**, care m-au susținut în acești cinci ani provocatori!

Cu deosebită recunoștință și dragoste, dedic această teză **bunicului meu**, care nu mai este printre noi, dar va fi mereu în inima mea ♥.

Ma înclin în fața dumneavoastră!

Drd. ing. Nina-Nicoleta Condurache (Lazăr)

Cuprins

	Rezumat	Teză
Introducere	1	1
Abrevieri	-	4
Listă de figuri	-	7
Listă de tabele	-	10
I. Studiu documentar		
Capitolul 1. Vinetele		
1.1. Scurtă istorie a vinetelor	-	13
1.2. Generalități	-	13
Capitolul 2. Compuși biologic activi		
2.1. Generalități	-	14
2.2. Antocianii		
2.2.1. Structură chimică	-	15
2.2.2. Surse de antociani	-	16
2.2.3. Activitate antioxidantă	-	17
2.2.4. Beneficii asupra sănătății	-	18
2.2.5. Biodisponibilitate, bioaccesibilitate și stabilitate	-	18
Capitolul 3. Extracția și caracterizarea compușilor biologic activi		
3.1. Tehnici convenționale de extracție	-	20
3.2. Tehnici moderne de extracție	-	20
3.3. Metode de separare, purificare, identificare și cuantificare	-	21
Capitolul 4. Peptide biologic active		
4.1. Generalități	-	22
4.2. Surse de peptide	-	22
4.3. Beneficii asupra sănătății	-	23
4.4. Metode de obținere	-	24
Capitolul 5. Bacterii lactice		
5.1. Generalități	-	25
5.2. Beneficii asupra sănătății	-	25
Capitolul 6. Încapsularea compușilor biologic activi		
6.1. Generalități	-	26
6.2. Metode de încapsulare	-	26
6.3. Materiale de încapsulare	-	27
Capitolul 7. Alimente funcționale		
7.1. Generalități	-	28
Referințe bibliografice	-	29
II. Studiu experimental – contribuții proprii	3	35
Capitolul 8. Extracția și caracterizarea compușilor biologic activi din cojile de vinete		
8.1. Aspecte generale	-	36
8.2. Obiectivele studiului	3	37
8.3. Materiale și metode		
8.3.1. Reactivi	-	37

8.3.2. Pregătirea inițială a cojilor de vinete	-	38
8.3.3. Extractia compușilor biologic activi din cojile de vinete utilizând diferite metode și parametri	-	38
8.3.4. Determinarea concentrației totale de antociani	-	39
8.3.5. Determinarea concentrației totale de flavonoide	-	40
8.3.6. Determinarea concentrației totale de polifenoli	-	40
8.3.7. Determinarea activității antioxidante	-	40
8.3.8. Analiza cromatografică a extractelor din cojile de vinete	-	41
8.3.9. Determinarea activității biologice a extractelor din cojile de vinete	-	41
8.3.10. Simularea digestibilității <i>in vitro</i> a antocianilor din cojile de vinete	-	42
8.3.11. Cinetica degradării termice a antocianilor din cojile de vinete	-	42
8.3.12. Analiza statistică a datelor	-	43
8.4. Rezultate și discuții		
8.4.1. Concentrațiile de antociani ale extractelor recuperate prin metode convenționale și moderne	3	43
8.4.2. Concentrațiile de flavonoide din extractele obținute prin metode convenționale și moderne	5	47
8.4.3. Concentrațiile de polifenoli totali ale extractelor furnizate de metode convenționale și moderne	6	49
8.4.4. Activitatea antioxidantă a extractelor obținute prin metode convenționale și moderne	7	52
8.4.5. Profilul cromatografic al compușilor biologic activi din cojile de vinete	8	54
8.4.6. Capacitatea extractelor din cojile de vinete de inhibare <i>in vitro</i> a enzimelor	9	55
8.4.7. Digestibilitatea <i>in vitro</i> a antocianilor din cojile de vinete	10	57
8.4.8. Cinetica degradării termice a antocianilor din cojile de vinete	11	57
8.5. Concluzii parțiale	12	60
Referințe bibliografice	-	61
Capitolul 9. Hidroliza proteinelor din zer		
9.1. Aspecte generale	-	66
9.2. Obiectivele studiului	14	66
9.3. Materiale și metode		
9.3.1. Reactivi	-	66
9.3.2. Obținerea hidrolizatelor proteice	-	67
9.3.3. Determinarea gradului de hidroliză	-	69
9.3.4. Determinarea activității antioxidante	-	70
9.3.5. Determinarea efectului prebiotic al hidrolizatelor proteice	-	70
9.3.6. Analiza statistică a datelor	-	70
9.4. Rezultate și discuții		
9.4.1. Caracterizarea hidrolizatelor proteice	14	70
9.4.2. Efectul prebiotic al hidrolizatelor proteice	15	72
9.5. Concluzii parțiale	15	73
Referințe bibliografice	-	73
Capitolul 10. Studii privind legarea și stingerea fluorescenței proteinelor și peptidelor din zer prin adăugarea de compuși biologic activi din cojile de vinete		
10.1. Aspecte generale	-	76
10.2. Obiectivele studiului	16	76
10.3. Materiale și metode		
10.3.1. Reactivi	-	76

10.3.2. Stingerea fluorescenței proteinelor și peptidelor din zer tratate termic prin adaosul de compuși biologic activi din cojile de vinete	-	77
10.4. Rezultate și discuții		
10.4.1. Stingerea fluorescenței β -Lg	16	78
10.4.2. Stingerea fluorescenței Lf	18	80
10.4.3. Stingerea fluorescenței proteinelor din zer	19	82
10.4.4. Stingerea fluorescenței peptidelor din zer	20	85
10.5. Concluzii parțiale	22	87
Referințe bibliografice	-	87

Capitolul 11. Dezvoltarea de ingrediente funcționale pe bază de antociani din cojile de vinete și peptide bioactive din zer

11.1. Aspecte generale	-	89
11.2. Obiectivele studiului	23	90
11.3. Materiale și metode		
11.3.1. Reactivi	-	90
11.3.2. Microîncapsularea compușilor biologic activi din cojile de vinete prin tehnica de liofilizare	-	90
11.3.3. Microîncapsularea compușilor biologic activi din cojile de vinete prin tehnica de gelifiere	-	94
11.3.4. Determinarea profilului fitochimic și a eficienței de încapsulare a pudrelor	-	95
11.3.5. Evaluarea viabilității bacteriilor lactice adăugate în pudre	-	96
11.3.6. Determinarea conținutului de compuși fitochimici în timpul depozitării pudrelor	-	96
11.3.7. Determinarea structurii morfologice a particulelor	-	96
11.3.8. Determinarea digestibilității <i>in vitro</i> a antocianilor din ingredientele încapsulate	-	96
11.3.9. Testarea biocompatibilității <i>in vitro</i> a pulberilor	-	97
11.3.10. Analiza statistică a datelor	-	97
11.4. Rezultate și discuții		
11.4.1. Caracterizarea fitochimică și eficiența încapsulării compușilor din pudre	23	98
11.4.2. Stabilitatea la depozitare a compușilor din pudre	26	102
11.4.3. Structura morfologică a pulberilor	31	107
11.4.4. Digestibilitatea <i>in vitro</i> a antocianilor din pulberi	33	111
11.4.5. Biocompatibilitatea <i>in vitro</i> a pulberilor	34	113
11.5. Concluzii parțiale	37	117
Referințe bibliografice	-	118

Capitolul 12. Dezvoltarea de tehnologii pentru alimente cu valoare adăugată

12.1. Aspecte generale	-	123
12.2. Obiectivele studiului	38	123
12.3. Materiale și metode		
12.3.1. Reactivi	-	123
12.3.2. Prepararea de bezele cu valoare adăugată	-	124
12.3.3. Prepararea de înghețată cu valoare adăugată	-	125
12.3.4. Prepararea de sosuri pentru desert cu valoare adăugată	-	125
12.3.5. Determinarea profilului fitochimic al produselor cu valoare adăugată	-	126
12.3.6. Determinarea stabilității fitochimice în timpul depozitării produselor obținute	-	127

12.3.7. Analiza texturii sosurilor pentru desert	-	127
12.3.8. Analiza statistică a datelor	-	127
12.4. Rezultate și discuții		
12.4.1. Caracterizarea și stabilitatea fitochimică la depozitarea în timp a bezelor cu valoare adăugată	38	127
12.4.2. Caracterizarea și stabilitatea fitochimică la depozitarea în timp a înghețatei cu valoare adăugată	38	128
12.4.3. Caracterizarea și stabilitatea fitochimică la depozitarea în timp a sosurilor pentru desert cu valoare adăugată	39	128
12.4.4. Caracterizarea texturii sosurilor pentru desert cu valoare adăugată	40	130
12.5. Concluzii parțiale	40	131
Referințe bibliografice	-	131
Capitolul 13. Concluzii generale	42	133
Capitolul 14. Contribuții originale și perspective de continuare a studiului		
14.1. Contribuții originale	44	135
14.2. Perspective de continuare a studiului	44	135
Capitolul 15. Diseminarea rezultatelor	45	136

Cuvinte cheie: coji de vinete; microîncapsulare; antociani; peptide; bacterii lactice; produse alimentare cu valoare adăugată;

INTRODUCERE

Teza de doctorat intitulată **„Proiectarea de ingrediente noi pe bază de compuși bioactivi din vinete pentru diferite aplicații în industria alimentară”** a avut ca scop studierea și valorificarea compușilor biologic activi (în principal antociani) prin formularea de ingrediente funcționale pentru aplicarea în industria alimentară. Studiul se concentrează pe cojile de vinete, cunoscute pentru compușii lor cu valoare biologică (în special antociani) și activitatea antioxidantă.

În contextul actual, cercetările desfășurate pe parcursul studiilor de doctorat au avut următoarele obiective:

- extracția, identificarea și cuantificarea compușilor biologic activi din cojile de vinete;
- caracterizarea complexă a extractelor din cojile de vinete;
- hidroliza enzimatică a proteinelor din zer pentru a furniza peptide cu activitate antioxidantă și efect prebiotic;
- studiul interacțiunii dintre antociani, proteinele și peptidele din zer;
- formularea și caracterizarea de ingrediente funcționale prin încapsularea compușilor biologic activi din cojile de vinete;
- formularea și caracterizarea de produse alimentare cu valoare adăugată prin adaosul de pulberi funcționale obținute prin încapsularea compușilor biologic activi din cojile de vinete.

Teza de doctorat este structurată în două părți, după cum urmează:

I. Studiu documentar care constă în 7 capitole ce prezintă date recente din literatura de specialitate privind vinetele, metode de identificare și caracterizare a compușilor activi biologic, metode de obținere a peptidelor din proteinele zerului, beneficii ale compușilor bioactivi, peptidelor și bacteriilor lactice asupra sănătății, metode de încapsulare și conceptul de aliment funcțional.

II. Studiu experimental care constă în 6 capitole ce acoperă investigațiile originale efectuate în timpul cercetării doctorale, așa cum este descris mai jos.

Capitolul 8. „Extracția și caracterizarea compușilor biologic activi din cojile de vinete” prezintă date privind extracția, identificarea și cuantificarea compușilor bioactivi din cojile de vinete folosind metode spectrofotometrice și tehnici de cromatografie. De asemenea, prezintă datele investigației privind comportamentul compușilor bioactivi în sistemul gastrointestinal simulat și capacitatea acestora de a inhiba enzimele responsabile de apariția a diferite boli asociate sindromului metabolic. Sunt prezentate și rezultatele investigațiilor privind comportamentul biochimic al compușilor biologic activi la tratamentul termic. Modelele cinetice de ordinul întâi au descris mecanismele de degradare termică.

Capitolul 9. „Hidroliza proteinelor din zer” prezintă date despre hidroliza enzimatică a proteinelor din zer prin variarea parametrilor. Caracterizarea hidrolizatelor a vizat gradul de hidroliză, activitatea antioxidantă și efectul prebiotic.

Capitolul 10. „Studii de legare și stingere a fluorescenței proteinelor și peptidelor din zer prin adaosul de compuși biologic activi din cojile de vinete” prezintă rezultatele mecanismului de legare dintre compușii biologic activi din extractele din coji de vinete și proteine/peptide.

Capitolul 11. „Dezvoltarea ingredientelor funcționale pe bază de antociani din coji de vinete și peptide bioactive din zer” prezintă date legate de microîncapsularea compușilor din extractul de coji de vinete folosind diferite materiale și tehnici de încapsulare. Microcapsulele au fost caracterizate prin eficiența de încapsulare, concentrația de compuși fitochimici, activitatea antioxidantă, stabilitatea compușilor fitochimici la depozitarea în timp, structura morfologică, digestibilitatea și citotoxicitate *in vitro*.

Capitolul 12. „Dezvoltarea tehnologiilor de obținere a alimentelor cu valoare adăugată” prezintă tehnologiile de obținere a unor alimente funcționale îmbogățite cu microcapsule pe bază de extracte din coji de vinete. Produsele cu valoare adăugată au fost caracterizate din punct de vedere al concentrațiilor de compuși fitochimici și al stabilității acestora la depozitarea în timp.

Fiecare capitol al părții experimentale este structurat într-o succesiune logică, după cum urmează:

- **Introducerea** care prezintă obiectivele specifice ale studiului;
- **Materiale și metode** care descriu materialele și reactivii utilizați, dar și metodele de investigare, analiză, prelucrare și interpretare a datelor experimentale;
- **Rezultate și discuții** în care datele originale sunt evidențiate în comparație cu datele deja existente în literatura de specialitate;
- **Concluzii parțiale;**
- **Referințe.**

Capitolul 13. „Concluzii generale” prezintă concluziile rezultate în urma investigațiilor asupra compușilor biologic activi din cojile de vinete și produselor alimentare cu valoare adăugată.

Teza de doctorat cuprinde 140 de pagini, 43 de figuri și 47 de tabele. Studiul documentar reprezintă 25 % din studiu, iar partea experimentală 75 % din studiu.

La finalul tezei de doctorat sunt prezentate **contribuțiile originale, perspectivele de cercetare ulterioară**, precum și **diseminarea rezultatelor** în domeniul cercetării. Astfel, rezultatele cercetării au fost valorificate prin elaborarea a **4 articole științifice**, publicate în **reviste ISI** (*Food and Bioprocess Technology, Food Chemistry, Plants, Inventions*), **3 cereri de brevete naționale**, precum și **16 comunicări la manifestări științifice** reprezentative pentru domeniul biotehnologie, din străinătate și din țară.

Activitățile de cercetare din cadrul tezei de doctorat s-au desfășurat cu ajutorul infrastructurii de cercetare din cadrul Centrului Integrat de Cercetare, Expertiză și Transfer Tehnologic (BioAliment-TehnIA) al Facultății Știința și Ingineria Alimentelor, din cadrul Universității „Dunărea de Jos” din Galați (www.bioaliment.ugal.ro).

Pe parcursul studiilor de doctorat, studentul a fost implicat în echipa de cercetare a unui proiect cu temă convergentă spre teza de doctorat. Proiectul a fost intitulat „*Închiderea lanțurilor valorice în bioeconomie prin obținerea de bioproduse inovatoare solicitate de piață*”, acronim PRO-SPER, numărul PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0569-PRO-SPER (10PCCI), director de proiect Prof. dr. ing. Gabriela Elena Bahrim.

Teza a fost coordonată științific de **Prof. dr. ing. Gabriela RÂPEANU** în calitate de conducător de doctorat și a comisiei de îndrumare formată din **prof. dr. ing. Iuliana APRODU**, **Prof. dr. ing. Gabriela Elena BAHRIM**, și **prof. dr. ing. Nicoleta STĂNCIUC**.

II. Studiu experimental – contribuții proprii

CAPITOLUL 8. EXTRAȚIA ȘI CARACTERIZAREA COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI DIN COJILE DE VINETE

8.2. Obiectivele studiului

Acest studiu a urmărit obținerea de extracte din coji de vinete cu concentrații ridicate de compuși biologic activi, în special antociani, și caracterizarea acestora fitochimică și funcțională. Astfel, principalele obiective ale acestui studiu au fost:

- testarea a patru metode diferite de extracție, cum ar fi: extracția convențională cu solvenți, asistată de ultrasunete, asistată de microunde și asistată de enzime;
- varierea parametrilor de extracție pentru a alege condițiile optime;
- determinarea concentrațiilor totale de antociani, flavonoide, polifenoli, precum și capacitatea antioxidantă;
- identificarea și cuantificarea antocianilor din extractele de coji de vinete prin tehnici de cromatografie lichidă;
- monitorizarea comportamentului compușilor biologic activi în timpul simulării digestiei *in vitro* și a tratamentului termic.

8.4. Rezultate și discuții

8.4.1. Concentrațiile de antociani ale extractelor recuperate prin metode convenționale și moderne

Tabelul 8.1 evidențiază efectele pe care anumite combinații de parametri le-au avut asupra procesului de extracție. ESL (extracția solid/lichid) a generat cele mai mari concentrații de antociani folosind etanol 70 % și 96 %, ambele acidulate cu HCl 1N la 50 °C timp de 30 min, fără diferențe semnificative între acestea ($p > 0,05$). Cea mai scăzută CTA a fost evidențiată pentru extracția cu etanol 96 % și CH₃COOH, indiferent de timpul sau temperatura utilizate.

EAU a dus la o concentrație maximă de antociani de $1,04 \pm 0,10$ mg D3G/g s.u., folosind etanol 96 % acidifiat cu HCl 1N, după 30 de min la 25 °C (**tabelul 8.2**). Soluția de etanol 96 % combinată cu CH₃COOH a condus la cele mai scăzute concentrații de antociani, indiferent de timpul și temperatura utilizate.

EAM a dus la concentrații mai scăzute de antociani decât celelalte două metode de extracție descrise anterior (**tabelul 8.3**). După 10 sec, soluția de etanol 70 % amestecată cu HCl 1N a eliberat o CTA maximă de $0,95 \pm 0,09$ mg D3G/g s.u. Pe de altă parte, soluția de etanol 96 % cu adaos de CH₃COOH a furnizat cea mai mică concentrație de antociani recuperată de EAM, la fel ca și în cazul celorlalte două proceduri ($0,01 \pm 0,01$ mg D3G/g s.u.).

Tabel 8.1. Concentrația totală de antociani (mg D3G/g coji de vinete uscate) extrasă cu ESL

Solvent	T°C	Acid acetic			Acid clorhidric		
		30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
EtOH	25	0,93±0,07 ^{aA*1}	0,96±0,01 ^{aB*1}	0,93±0,04 ^{aC*1}	0,99±0,04 ^{aA*1}	0,98±0,03 ^{aB*1}	1,01±0,01 ^{aC*1}
50 %	50	1,07±0,13 ^{aA*4}	0,79±0,05 ^{bC#4}	0,74±0,03 ^{bE#4}	0,87±0,03 ^{bB#4}	0,90±0,02 ^{cD#4}	0,94±0,09 ^{cF*4}
EtOH	25	0,67±0,05 ^{aA*2}	0,72±0,04 ^{abC*2}	0,76±0,07 ^{aE*2}	0,84±0,06 ^{cB*2}	0,84±0,08 ^{cD*2}	0,87±0,04 ^{cF*2}
70 %	50	0,92±0,04 ^{aA*5}	0,88±0,08 ^{aC*4}	0,83±0,07 ^{aD*5}	1,01±0,07 ^{cB*5}	0,96±0,08 ^{cC*4}	1,02±0,08 ^{cE*4}
EtOH	25	0,21±0,02 ^{aA*3}	0,19±0,01 ^{abC*3}	0,16±0,02 ^{aE*3}	0,93±0,07 ^{cB*1}	0,92±0,08 ^{cD*12}	1,01±0,11 ^{cF*1}
96 %	50	0,22±0,02 ^{aA*6}	0,26±0,02 ^{abC*5}	0,28±0,02 ^{bE*6}	1,11±0,09 ^{cB*5}	1,13±0,11 ^{cD*5}	1,06±0,07 ^{cF*4}

Influența timpului a fost evidențiată cu litere mici pe linie; influența acidului a fost evidențiată cu majuscule pe linie; influența temperaturii a fost evidențiată prin simboluri (*, #, ○, ●, ♥, ◆) pe coloană, influența concentrației de etanol

a fost evidențiată prin cifre pe coloană. Valorile care au o literă mică/majusculă pe linie/simbol pe coloană/număr pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$)

Tabel 8.2. Concentrația totală de antociani (mg D3G/g coji de vinete uscate) generată de EAU

Solvent	T°C	Acid acetic			Acid clorhidric		
		15 min	30 min	45 min	15 min	30 min	45 min
EtOH	25	0,81±0,05 ^{Aa1}	0,78±0,07 ^{aB1}	0,79±0,09 ^{aC2}	0,77±0,07 ^{aA1}	0,84±0,07 ^{bB1}	0,82±0,08 ^{cC1}
50 %	50	0,70±0,06 ^{aA#3}	0,75±0,07 ^{aC3}	0,72±0,07 ^{aD3}	0,80±0,04 ^{bB3}	0,84±0,04 ^{cdC34}	0,91±0,04 ^{dE#3}
EtOH	25	0,79±0,03 ^{aA-1}	0,78±0,08 ^{aC-1}	0,85±0,07 ^{aD-2}	0,91±0,09 ^{bB-2}	0,90±0,09 ^{cC-1}	0,94±0,08 ^{cdD-12}
70 %	50	0,84±0,07 ^{aA-4}	0,73±0,05 ^{bB-3}	0,64±0,03 ^{bdD-4}	0,87±0,06 ^{cA-3}	0,93±0,08 ^{cC-3}	0,90±0,09 ^{cE-3}
EtOH	25	0,14±0,01 ^{aA*2}	0,20±0,01 ^{bC*2}	0,21±0,05 ^{bE*1}	0,98±0,08 ^{bB*2}	1,04±0,09 ^{cd*2}	0,97±0,07 ^{cF*1}
96 %	50	0,20±0,03 ^{aA*5}	0,22±0,02 ^{aC*4}	0,24±0,02 ^{aE*5}	0,79±0,06 ^{bB*3}	0,75±0,09 ^{cd*4}	0,95±0,08 ^{dF*3}

Influența timpului a fost evidențiată cu litere mici pe linie; influența acidului a fost evidențiată cu majuscule pe linie; influența temperaturii a fost evidențiată prin simboluri (*, #, ○, ●, ♥, ♦) pe coloană, influența concentrației de etanol a fost evidențiată prin cifre pe coloană. Valorile care au o literă mică/majusculă pe linie/simbol pe coloană/număr pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$)

Tabel 8.3. Concentrația totală de antociani (mg D3G/g coji de vinete uscate) obținută cu EAM

Solvent	Acid acetic		Acid clorhidric	
	10 sec	15 sec	10 sec	15 sec
EtOH 50 %	0,72±0,05 ^{Aa1}	0,68±0,05 ^{aB1}	0,77±0,05 ^{bA1}	0,75±0,05 ^{bC1}
EtOH 70 %	0,82±0,06 ^{aA2}	0,76±0,06 ^{aC2}	0,95±0,09 ^{bB2}	0,83±0,06 ^{cC1}
EtOH 96 %	0,01±0,01 ^{aA3}	0,06±0,01 ^{bC3}	0,76±0,06 ^{bB1}	0,77±0,03 ^{cd1}

Influența timpului a fost evidențiată cu litere mici pe linie; influența acidului a fost evidențiată cu majuscule pe linie; influența concentrației de etanol a fost evidențiată în cifre pe coloană. Valorile care au o literă mică/majusculă pe linie sau un număr de pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$)

Table 8.4. Concentrația totală de antociani (mg D3G/g coji de vinete uscate) generată de EAE

Enzimă/ Timp	1 h	2 h	3h
Celulază	0,29 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,02 ^b	0,15 ± 0,04 ^c
Enzime pectolitice	nd	nd	nd

Influența timpului a fost evidențiată cu litere mici pe linie. Valorile care au o literă mică nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$); Nd – nedetectat

După 1 oră de hidroliză, CTA maximă obținută cu celulază a fost de $0,29 \pm 0,02$ mg D3G/g s.u. Odată cu trecerea timpului, antocianii s-au degradat semnificativ ($p < 0,05$). Pe de altă parte, enzimele pectolitice din *Aspergillus niger* nu au dus la eliberarea antocianilor din pereții celulari nici după 3 ore de hidroliză (tabel 8.4).

Întrucât antocianii au reprezentat substanțele chimice de interes în investigația noastră, a fost esențial să selectăm metoda optimă și combinația de parametri potrivită pentru extracția lor din cojile de vinete. Având în vedere că scopul final al studiului a fost acela de a dezvolta un produs alimentar cu valoare adăugată pe bază de extract din coji de vinete, chiar dacă HCl a generat cele mai mari concentrații de antociani, acesta a fost omis din cauza potențialului său toxic. În plus, din cauza randamentelor slabe ale EAM și EAE în comparație cu celelalte două metode, acestea nu au fost luate în considerare. Ca urmare, au fost luate în considerare doar ESL și EAU cu CH_3COOH . Doar combinațiile de factori la 30 de min de extracție au fost folosite pentru a compara statistic datele. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 8.5.

Tabelul 8.5 sugerează că, spre deosebire de EAU, metoda convențională a permis recuperarea extractelor cu cel mai mare CTA după 30 de min la 50 °C utilizând CH_3COOH cu etanol 50 %. Cu toate acestea, nu au fost observate diferențe semnificative între aceste concentrații și cele măsurate la 25 °C ($p > 0,05$). Din cauza consumului redus de energie și a riscului de degradare a compușilor, EAU a fost preferată.

Tabel 8.5. Concentrațiile totale de antociani a cojilor de vinete (mg D3G/g coji de vinete uscate) obținute prin ESL și EAU după 30 de min

Solvent	T°C	Acid acetic	
		ESL	EAU
EtOH 50 %	25	0,93±0,07 ^{a1*}	0,78±0,07 ^{b1*}
	50	1,07±0,13 ^{a1•}	0,75±0,07 ^{b1◊}
EtOH 70 %	25	0,67±0,05 ^{a2#}	0,78±0,08 ^{b2*}
	50	0,92±0,04 ^{a3♥}	0,73±0,05 ^{b2◊}
EtOH 96 %	25	0,21±0,02 ^{a4◊}	0,20±0,01 ^{a3#}
	50	0,22±0,02 ^{a4♦}	0,22±0,02 ^{a3•}

Influența metodei a fost evidențiată cu litere mici pe linie; influența acidului a fost evidențiată cu majuscule pe linie; influența concentrației de etanol a fost evidențiată prin simboluri (*, #, ◊, ♥, ♦) pe coloană, influența temperaturii a fost evidențiată prin cifre pe coloană. Valorile care au o literă mică/majusculă pe linie/simbol pe coloană/număr pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p>0,05$)

8.4.2. Concentrațiile de flavonoide din extractele obținute prin metode convenționale și moderne

Tabelul 8.6 prezintă concentrația totală de flavonoide (CTF) obținută prin modificarea parametrilor din ESL. Cea mai mare CTF ($2,42 \pm 0,01$ mg CE/g s.u.) a fost obținută cu etanol 50% acidifiat cu CH_3COOH după 120 min la 25 °C. Cea mai scăzută concentrație de flavonoide de $0,51 \pm 0,05$ mg CE/g s.u. a fost obținută cu soluție de etanol 96% acidulată cu HCl 1N după 30 de min de extracție la 50 °C (**tabel 8.6**).

Tabelul 8.7 furnizează valorile CTF după utilizarea EAU prin varierea parametrilor. Extracția cu soluție apoasă de etanol 50% și adăugare de HCl 1N a prezentat cea mai mare CTF după numai 15 min la 25 °C ($3,18 \pm 0,30$ mg CE/g s.u.). Prin combinarea soluției de etanol 96 % cu HCl, după 30 min la 25 °C, a fost măsurată cea mai mică concentrație de $0,58 \pm 0,05$ mg CE/g s.u.

Tabel 8.6. Concentrația totală de flavonoide (mg EC/g coji de vinete uscate) furnizată de ESL

Solvent	T°C	Acid acetic			Acid clorhidric		
		30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
EtOH 50 %	25	2,38±0,13 ^{Aa1}	2,33±0,01 ^{aC1}	2,42±0,01 ^{aD1}	1,51±0,10 ^{bB1}	2,05±0,20 ^{cC1}	2,40±0,22 ^{dD1}
	50	1,15±0,07 ^{aA#4}	1,29±0,06 ^{bC#4}	0,74±0,06 ^{cE#4}	1,37±0,10 ^{dB*4}	1,11±0,07 ^{eD#4}	1,14±0,15 ^{fF#4}
EtOH 70 %	25	1,62±0,12 ^{aA-2}	1,67±0,06 ^{aC-2}	1,65±0,09 ^{aE-2}	0,70±0,03 ^{bB-2}	0,90±0,08 ^{bC-2}	1,05±0,26 ^{cF-2}
	50	1,99±0,07 ^{aA*5}	2,06±0,06 ^{aB*5}	2,37±0,05 ^{bD*5}	1,69±0,43 ^{dA*4}	1,09±0,05 ^{eC*4}	0,89±0,09 ^{eE-5}
EtOH 96 %	25	1,03±0,03 ^{aA*3}	0,78±0,07 ^{bC*3}	0,76±0,06 ^{bE*3}	1,19±0,08 ^{cB*3}	1,29±0,08 ^{cD*3}	1,29±0,11 ^{cF*2}
	50	0,83±0,05 ^{aA*6}	0,79±0,08 ^{aC*6}	1,04±0,10 ^{bE*6}	0,51±0,05 ^{cB*5}	0,96±0,06 ^{dD*5}	1,13±0,06 ^{eF*4}

Influența timpului a fost evidențiată cu litere mici pe linie; influența acidului a fost evidențiată cu majuscule pe linie; influența temperaturii a fost evidențiată prin simboluri (*, #, ◊, ♥, ♦) pe coloană, influența concentrației de etanol a fost evidențiată prin cifre pe coloană. Valorile care au o literă mică/majusculă pe linie/simbol pe coloană/număr pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p>0,05$)

Tabel 8.7. Concentrația totală de flavonoide (mg EC/g coji de vinete uscate) generată de EAU

Solvent	T°C	Acid acetic			Acid clorhidric		
		15 min	30 min	45 min	15 min	30 min	45 min
EtOH 50 %	25	2,78±0,06 ^{Aa1}	2,47±0,25 ^{abC1}	2,10±0,06 ^{bE1}	3,18±0,30 ^{cA1}	2,76±0,31 ^{cC1}	1,66±0,08 ^{dF1}
	50	1,86±0,16 ^{aA#4}	1,70±0,10 ^{abD#4}	1,60±0,12 ^{bG#4}	0,70±0,05 ^{cB#4}	0,77±0,08 ^{cE#4}	1,33±0,12 ^{dH#4}
EtOH 70 %	25	1,18±0,10 ^{abA-2}	1,30±0,07 ^{aD-2}	1,13±0,07 ^{bG-2}	1,40±0,06 ^{cB-2}	1,07±0,05 ^{dE-2}	2,44±0,11 ^{eH-2}
	50	2,19±0,03 ^{aA*5}	1,84±0,11 ^{bD*4}	1,84±0,08 ^{bG*5}	1,06±0,08 ^{cB*5}	1,07±0,08 ^{cE-5}	1,15±0,09 ^{cH*5}
EtOH 96 %	25	0,44±0,09 ^{aA*3}	0,54±0,02 ^{bC*3}	0,52±0,04 ^{abE*3}	1,21±0,11 ^{cB*2}	0,58±0,05 ^{dC*3}	0,61±0,05 ^{dE*3}
	50	0,92±0,07 ^{aA*6}	1,05±0,05 ^{bC*5}	1,03±0,11 ^{bF*6}	1,31±0,11 ^{cB*6}	1,22±0,08 ^{cD*6}	1,20±0,10 ^{cG*45}

Influența timpului a fost evidențiată cu litere mici pe linie; influența acidului a fost evidențiată cu majuscule pe linie; influența temperaturii a fost evidențiată prin simboluri (*, #, ◊, ♥, ♦) pe coloană, influența concentrației de etanol a fost evidențiată prin cifre pe coloană. Valorile care au o literă mică/majusculă pe linie/simbol pe coloană/număr pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p>0,05$)

Tabelul 8.8 arată CTF recuperat cu EAM prin varierea parametrilor. După 10 sec la microunde, soluția apoasă de etanol 70 % cu CH₃COOH a extras cea mai mare CTF de 2,76 ± 0,25 mg CE/g s.u. Cele mai scăzute concentrații de flavonoide au fost atinse cu 96% etanol, la fel ca în EAU.

Tabel 8.8. Concentrația totală de flavonoide (mg EC/g coji de vinete uscate) din extractul EAM

Solvent	Acid acetic		Acid clorhidric	
	10 sec	15 sec	10 sec	15 sec
EtOH 50 %	2,59±0,19 ^{Aa1}	2,14±0,20 ^{bC1}	1,85±0,16 ^{cB1}	1,89±0,07 ^{cD1}
EtOH 70 %	2,76±0,25 ^{aA1}	2,47±0,17 ^{bC2}	2,56±0,24 ^{cA2}	2,49±0,23 ^{cC2}
EtOH 96 %	1,37±0,13 ^{aA2}	1,44±0,14 ^{aC3}	1,36±0,13 ^{bA3}	0,77±0,06 ^{cD3}

Influența timpului a fost evidențiată cu litere mici; influența acidului a fost evidențiată cu majuscule pe linie; influența concentrației de etanol a fost evidențiată în coloană. Valorile care au o literă mică/majusculă pe o linie sau un număr pe o coloană nu sunt semnificativ diferite ($p>0,05$)

Tabelul 8.9 ilustrează CTF obținută prin varierea parametrilor în abordarea EAE. Celulaza a dus la eliberarea celei mai mari concentrații de flavonoide (1,54 ± 0,14 mg CE/g s.u.) după 2 ore.

Tabel 8.9. Concentrația totală de flavonoide (mg EC/g coji de vinete uscate) eliberată de EAE

Enzimă/Timp	1 h	2 h	3 h
Celulază	1,33±0,12 ^{Aa}	1,54±0,14 ^{aA}	1,42±0,14 ^{abA}
Enzime pectolitice	1,11±0,05 ^{aB}	1,05±0,06 ^{aB}	1,05±0,10 ^{aB}

Influența timpului a fost evidențiată cu litere mici; influența enzimei a fost evidențiată cu majuscule pe coloană. Valorile care au o literă mică/majusculă pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p>0,05$)

8.4.3. Concentrațiile de polifenoli ale extractelor furnizate prin metode convenționale și moderne

Tabelul 8.10 evidențiază CTP rezultată în urma extracțiilor efectuate. Cea mai mare CTP obținută cu ESL a fost de 15,01 ± 1,85 mg EAG/g s.u. cu soluție apoasă de etanol 70% și HCl după 60 de min la 50 °C. Cele mai scăzute valori ale CTP au fost generate cu soluție de etanol 96 % și CH₃COOH.

Cea mai mare CTP rezultată după EAU (**tabel 8.11**) a fost obținută cu soluție de etanol 50 % și CH₃COOH după 30 de min de tratament la 50 °C (19,71 ± 0,82 mg EAG/g s.u.). Ca și în cazul antocianilor, cel mai mic randament CTP a fost produs cu etanol 96 % acidulat cu CH₃COOH, având valori cu 76 % mai mici decât cele realizate cu soluție apoasă de etanol 50 % și CH₃COOH.

În cazul EAM (**tabel 8.12**), etanol 96 % acidifiat cu CH₃COOH a avut cel mai mic randament. În schimb, când CH₃COOH a fost înlocuit cu HCl, cea mai mare CTP de 14,44 ± 0,49 mg EAG/g s.u. a fost atins după 15 sec de tratament cu microunde.

Tabel 8.10. Concentrația totală de polifenoli (mg EAG/g coji de vinete uscate) extrași prin ESL

Solvent	T°C	Acid acetic			Acid clorhidric		
		30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
EtOH	25	12,01±0,39 ^{Aa*1}	13,10±0,94 ^{aB*1}	13,86±0,55 ^{aC*1}	13,78±0,36 ^{bA*1}	13,66±0,55 ^{bB*1}	14,60±1,16 ^{bC*1}
50 %	50	12,68±0,28 ^{abA*4}	12,52±0,24 ^{aC*4}	12,94±0,27 ^{bE*4}	13,16±0,19 ^{cB*4}	13,15±0,38 ^{cD*4}	14,23±0,32 ^{dF*4}
EtOH	25	11,01±0,14 ^{aA*2}	11,29±0,40 ^{abC*2}	11,74±0,28 ^{bE*2}	13,54±0,37 ^{cdB*1}	13,14±0,53 ^{cD*1}	14,04±0,61 ^{dF*12}
70 %	50	12,64±1,01 ^{aA*4}	12,50±1,13 ^{aC*4}	12,56±1,05 ^{aE*4}	14,69±1,29 ^{bB*5}	15,01±1,85 ^{bD*5}	14,68±1,43 ^{bF*4}
EtOH	25	5,23±0,48 ^{aA*3}	4,82±0,24 ^{abC*3}	4,50±0,16 ^{bE*3}	12,67±0,81 ^{cB*2}	11,68±1,29 ^{cD*2}	12,89±0,56 ^{cF*2}
96 %	50	6,69±0,40 ^{aA*5}	7,24±0,16 ^{abC*5}	7,67±0,59 ^{bE*5}	13,88±1,14 ^{cdB*45}	14,09±0,44 ^{dD*45}	14,82±0,83 ^{ef*4}

Influența timpului a fost evidențiată cu litere mici pe linie; influența acidului a fost evidențiată cu majuscule pe linie; influența temperaturii a fost evidențiată prin simboluri (*, #, ○, ●, ♥, ♦) pe coloană, influența concentrației de etanol a fost evidențiată prin cifre pe coloană. Valorile care au o literă mică/majusculă pe linie/simbol pe coloană/număr pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p>0,05$)

Tabel 8.11. Concentrația totală de polifenoli furnizată de EAU

Solvent	T°C	Acid acetic			Acid clorhidric		
		15 min	30 min	45 min	15 min	30 min	45 min
EtOH	25	13,38±0,58 ^{Aa*1}	13,18±0,62 ^{aB*1}	13,52±0,61 ^{aC*1}	13,29±0,65 ^{bA*1}	13,34±0,65 ^{bB*1}	13,76±0,72 ^{bC*12}
50 %	50	13,17±0,49 ^{aA*4}	19,71±0,82 ^{bC#4}	12,52±0,28 ^{aE#4}	14,29±0,53 ^{cB#4}	13,62±0,85 ^{cD*4}	14,53±0,66 ^{cF*4}
EtOH	25	11,73±0,34 ^{aA◦2}	11,42±0,53 ^{aC◦2}	11,97±0,48 ^{aE◦2}	13,94±0,31 ^{bB◦1}	13,69±0,67 ^{bD◦1}	14,29±0,86 ^{bF◦1}
70 %	50	12,41±0,75 ^{aA◦4}	12,47±1,19 ^{aC◦5}	12,34±0,61 ^{aE◦4}	13,79±0,86 ^{bB◦4}	14,19±1,05 ^{bD◦4}	14,64±0,97 ^{bF◦4}
EtOH	25	4,79±0,39 ^{aA♥3}	5,00±0,42 ^{aC♥3}	4,77±0,41 ^{aE♥3}	13,93±1,18 ^{bB♥1}	14,01±1,87 ^{bD♥1}	13,05±0,72 ^{bF♥2}
96 %	50	5,97±0,46 ^{abA*5}	6,33±0,72 ^{aC*6}	5,42±0,37 ^{bE*5}	12,60±0,84 ^{cB*5}	12,76±0,99 ^{cD*4}	13,25±0,67 ^{cF*5}

Influența timpului a fost evidențiată cu litere mici pe linie; influența acidului a fost evidențiată cu majuscule pe linie; influența temperaturii a fost evidențiată prin simboluri (*, #, ◦, ♥, ♦) pe coloană, influența concentrației de etanol a fost evidențiată prin cifre pe coloană. Valorile care au o literă mică/majusculă pe linie/simbol pe coloană/număr pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p>0,05$)

Tabel 8.12. Concentrația totală de polifenoli (mg EAG/g coji de vinete uscate) dobândită cu EAM

Solvent	Acid acetic		Acid clorhidric	
	10 sec	15 sec	10 sec	15 sec
EtOH 50 %	12,8±0,93 ^{Aa1}	11,88±0,94 ^{aB1}	13,38±0,94 ^{bA1}	14,06±0,69 ^{bC1}
EtOH 70 %	12,06±1,45 ^{aA1}	11,54±0,84 ^{aB1}	13,35±0,82 ^{bA1}	14,08±0,76 ^{bC1}
EtOH 96 %	6,01±0,18 ^{aA2}	6,47±0,64 ^{aC2}	13,55±0,56 ^{bB1}	14,44±0,49 ^{cD1}

Valorile care împărtășesc o literă pe linie/coloană nu sunt semnificativ diferite ($p>0,05$)

Extracția cu celulază a produs cea mai mare concentrație de polifenoli (**tabelul 8.13**). Cu toate acestea, amestecul de enzime pectolitice a atins jumătate din CTP recuperat cu celulază, cea mai mare concentrație fiind de $5,50 \pm 0,28$ mg EAG/g s.u./ după 2 ore de hidroliză.

Tabel 8.13. Concentrația totală de polifenoli (mg EAG/g coji de vinete uscate) generată de EAE

Enzimă/Timp	1 h	2 h	3 h
Celulază	10,68±0,27 ^{Aa}	10,85±0,37 ^{aA}	10,44±0,72 ^{aA}
Enzime pectolitice	5,43±0,40 ^{aB}	5,50±0,28 ^{aB}	4,63±0,48 ^{bB}

Influența timpului a fost evidențiată cu litere mici; influența enzimei a fost evidențiată cu majuscule pe coloană. Valorile care au o literă mică/majusculă pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p>0,05$)

8.4.4. Activitatea antioxidantă a extractelor obținute prin metode convenționale și moderne

Rezultatele activității antioxidante a extractelor din coji de vinete furnizate cu ESL sunt prezentate în **tabelul 8.14**. Rezultatele sunt exprimate ca $\mu\text{M ET/g s.u.}$. Supernatanții ESL au prezentat activitate antioxidantă ridicată, indiferent de combinația de parametri utilizată (**tabelul 8.14**). Activitatea antioxidantă a soluției apoase de etanol 70% a fost cea mai mare atunci când s-a adăugat CH_3COOH la 50°C după 120 de min ($42,84 \pm 2,69 \mu\text{M ET/g s.u.}$). Această valoare este echivalentă cu un procent de inhibare a DPPH de $93,29 \pm 0,15 \%$. Cu toate acestea, cea mai scăzută activitate antioxidantă a fost evidențiată prin extracția cu soluție apoasă de etanol 70 % și HCl la 25°C după 30 de min ($25,34 \pm 1,88 \mu\text{M ET/g s.u.}$). Această valoare este echivalentă cu un procent de inhibare a DPPH de $74,97 \pm 0,43 \%$.

EAU a permis atingerea activităților antioxidante între $20,64 \pm 1,93$ și $37,90 \pm 0,64 \mu\text{M ET/g s.u.}$, procentul de inhibare a DPPH fiind între $60,62 \pm 1,45 \%$ și $91,83 \pm 0,57 \%$ (**tabelul 8.15**).

Valorile activității antioxidante ale extractelor produse prin tehnica EAM sunt enumerate în **tabelul 8.16**. În ansamblu, EAM cu etanol 50% a avut cel mai bun randament, prezentând activități antioxidante cu valori cuprinse între $44,14 \pm 0,47$ și $45,18 \pm 0,38 \mu\text{M ET/g s.u.}$, nefiind semnificativ diferite ($p>0,05$), indiferent de timpul de extracție. Aceste valori sunt echivalente cu valori cuprinse între $89,81 \pm 1,34$ și $91,20 \pm 0,56 \%$ de inhibiție DPPH.

Tabelul 8.17 prezintă activitățile antioxidante ale extractelor dobândite cu EAE. În comparație cu amestecul de enzime pectolitice, celuloza a avut cel mai mare randament în ceea ce privește activitatea antioxidantă. O oră de extracție a dus la $55,60 \pm 3,36 \mu\text{M TE/g}$ s.u., corespunzând cu $88,32 \pm 0,15\%$ inhibiție a DPPH. Activitatea antioxidantă a extractelor obținute cu enzime pectolitice a fost considerabil mai mică decât cea a extractelor cu celuloză ($p < 0,05$), scăzând de asemenea în timp. Astfel, pentru enzimele pectolitice s-au înregistrat activități antioxidante cu valori între $24,05 \pm 1,32$ și $27,36 \pm 0,77 \mu\text{M TE/g}$ s.u.

Tabel 8.14. Activitatea antioxidantă ($\mu\text{M ET/g}$ coji de vinete uscate) a extractelor furnizate de ESL

Solvent	T°C	Acid acetic			Acid clorhidric		
		30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
EtOH	25	35,46±2,42 ^{Aa*1}	35,34±1,26 ^{aC*1}	35,08±1,62 ^{aE*1}	32,31±0,98 ^{bB*1}	32,12±0,91 ^{bD*1}	32,50±0,43 ^{bF*1}
50 %	50	32,69±0,77 ^{aA#3}	30,25±0,90 ^{bB#2}	32,69±1,45 ^{aC#2}	30,26±2,50 ^{aA*2}	31,12±2,12 ^{bB*3}	30,37±2,27 ^{cC#3}
EtOH	25	30,51±1,02 ^{aA~2}	33,83±1,87 ^{bC~1}	34,73±1,44 ^{bE~1}	25,34±1,90 ^{cB~2}	28,80±2,45 ^{dD~2}	27,67±1,35 ^{cdF~2}
70 %	50	42,54±2,95 ^{aA*4}	42,39±2,51 ^{aB*3}	42,84±2,69 ^{aC*3}	39,36±2,90 ^{bA*3}	39,85±3,20 ^{bB*4}	38,17±3,45 ^{bD*4}
EtOH	25	36,60±3,36 ^{aA*1}	34,34±0,78 ^{aC*1}	33,70±0,57 ^{aE*1}	31,89±3,01 ^{bB*1}	30,96±2,80 ^{bD*12}	29,75±2,05 ^{bF*2}
96 %	50	38,76±2,51 ^{aA*5}	38,44±2,53 ^{aB*4}	38,01±2,50 ^{aC*4}	34,92±3,45 ^{bA*4}	38,97±1,00 ^{75Bc*4}	32,61±2,55 ^{bD*3}

Influența timpului a fost evidențiată cu litere mici pe linie; influența acidului a fost evidențiată cu majuscule pe linie; influența temperaturii a fost evidențiată prin simboluri (*, #, ~, •, ♥, ♦) pe coloană, influența concentrației de etanol a fost evidențiată prin cifre pe coloană. Valorile care au o literă mică/majusculă pe linie/simbol pe coloană/număr pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$)

Tabel 8.15. Activitatea antioxidantă ($\mu\text{M ET/g}$ coji de vinete uscate) a extractelor colectate după EAU

Solvent	T°C	Acid acetic			Acid clorhidric		
		15 min	30 min	45 min	15 min	30 min	45 min
EtOH	25	37,90±0,64 ^{Aa*1}	37,81±0,59 ^{aB*1}	37,63±0,26 ^{aC*1}	37,06±0,66 ^{bA*1}	37,25±0,82 ^{bB*1}	35,30±0,25 ^{cd*1}
50 %	50	35,09±1,34 ^{aA#4}	34,99±0,54 ^{aB#4}	34,93±0,88 ^{aD#4}	34,39±0,17 ^{bA#4}	31,00±1,22 ^{bC#4}	29,75±1,13 ^{cE#4}
EtOH	25	37,17±0,43 ^{aA~2}	37,33±0,22 ^{aD~1}	36,62±0,22 ^{bG~2}	34,31±0,45 ^{cB~2}	32,74±0,40 ^{dE~2}	32,59±0,76 ^{dH~2}
70 %	50	36,25±0,61 ^{aA~5}	36,20±0,54 ^{aC*5}	36,25±0,61 ^{aE~4}	32,10±2,00 ^{bB~4}	33,54±0,65 ^{cd*5}	32,10±2,00 ^{cF~5}
EtOH	25	30,15±0,27 ^{aA*3}	30,34±0,54 ^{aC*2}	30,26±0,90 ^{aE*3}	22,46±1,00 ^{bB*3}	20,64±1,95 ^{bD*3}	21,69±1,00 ^{bF*3}
96 %	50	35,50±0,77 ^{aA*4}	35,35±1,02 ^{aC*45}	35,24±1,26 ^{aE*4}	32,64±2,45 ^{bB*4}	32,86±1,76 ^{bD*45}	32,65±1,35 ^{bF*5}

Influența timpului a fost evidențiată cu litere mici pe linie; influența acidului a fost evidențiată cu majuscule pe linie; influența temperaturii a fost evidențiată prin simboluri (*, #, ~, •, ♥, ♦) pe coloană, influența concentrației de etanol a fost evidențiată prin cifre pe coloană. Valorile care au o literă mică/majusculă pe linie/simbol pe coloană/număr pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$)

Tabel 8.16. Activitatea antioxidantă ($\mu\text{M ET/g}$ coji de vinete uscate) a extractelor recuperate prin EAM

Solvent	Acid acetic		Acid clorhidric	
	10 sec	15 sec	10 sec	15 sec
EtOH 50 %	45,18±0,32 ^{Aa1}	44,99±0,39 ^{aB1}	45,08±0,45 ^{bA1}	44,72±0,69 ^{bB1}
EtOH 70 %	36,65±0,57 ^{aA2}	36,71±0,38 ^{aB2}	36,12±0,38 ^{bA2}	35,89±0,42 ^{bC2}
EtOH 96 %	34,63±0,41 ^{aA3}	32,67±2,28 ^{aC3}	33,37±0,52 ^{bB3}	33,83±0,71 ^{bC3}

Valorile care împart o literă pe linie/linie nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$)

Tabel 8.17. Activitatea antioxidantă a extractelor produse de EAE

Enzimă/Timp	1 h	2 h	3 h
Celuloză	55,60±3,36 ^{Aa}	55,12±4,12 ^{aA}	53,77±5,67 ^{aA}
Enzime pectolitice	27,36±0,77 ^{aB}	26,79±2,09 ^{aB}	24,05±1,32 ^{bB}

Influența timpului a fost evidențiată cu litere mici; influența enzimei a fost evidențiată cu majuscule pe coloană. Valorile care au o literă mică/majusculă pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$)

8.4.5. Profilul cromatografic al compuși bioactivi din coji de vinete

Analiza HPLC a evidențiat prezența derivaților de delfinidină, cianidină și petunidină. Astfel, pentru toate cele trei extracte analizate au fost identificați următorii compuși: delfinidin 3-O-rutinozid-5-glucozid, delfinidin 3-O-glucozid, delphinidin 3-O-rutinozid, cianidin 3-O-rutinozid și petunidin 3-O-rutinozid (**figura 8.1**).

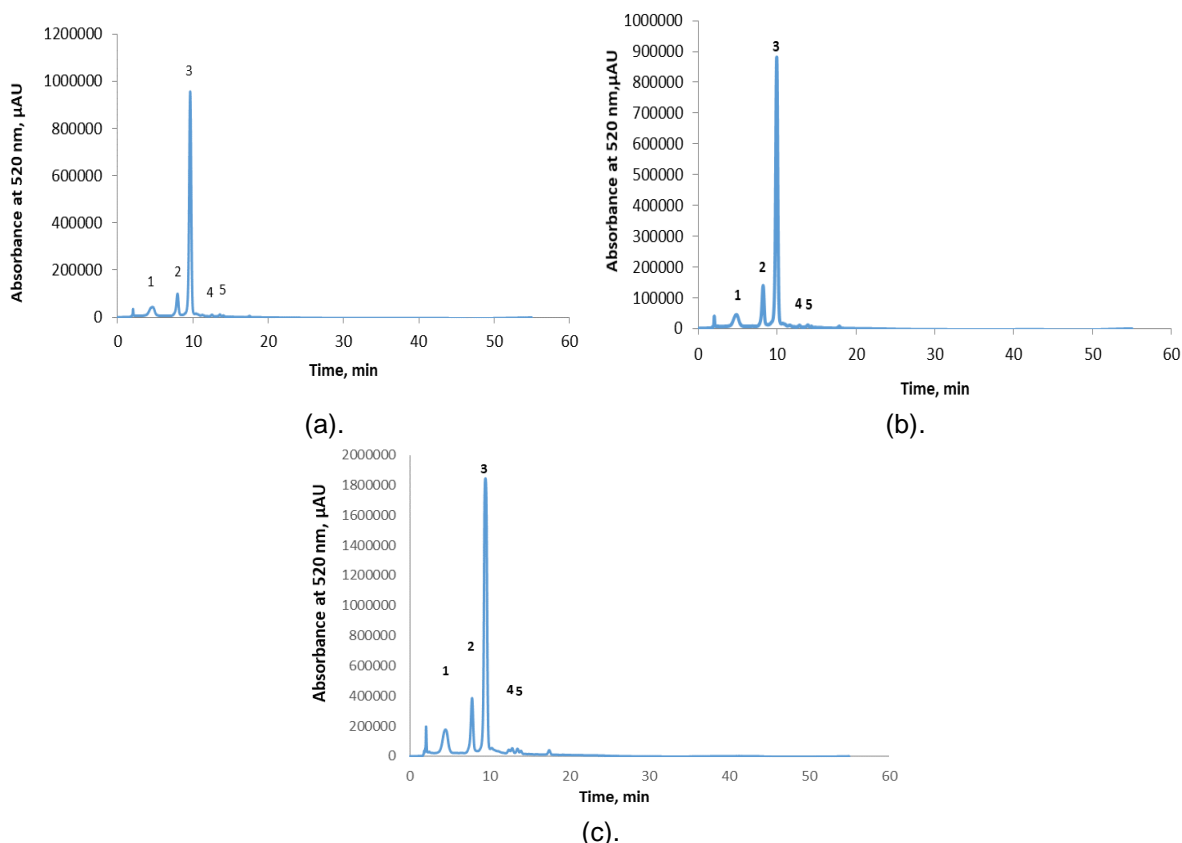


Figura 8.1. Profilul cromatografic al extractelor din coji de vinete colectate după SLE (A), UAE (B) și MAE (C): Peak 1 – delphinidin 3-O-rutinozid-5-glucozid; Peak 2 – delphinidin 3-O-glucozid; Peak 3 – delphinidin 3-O-rutinozid; Peak 4 – cianidin 3-O-rutinozid, Peak 5 - petunidin-3-O-rutinozid

Analiza HPLC, ca și analiza spectrofotometrică, a evidențiat o variabilitate a CTA pentru cele trei tehnici de extracție examinate. Componenta predominantă în toate cele trei extracte a fost delphinidin 3-O-rutinozid.

În urma examinărilor spectrofotometrice și cromatografice ale extractelor obținute folosind diverse procedee și parametri, s-a ales metoda convențională ca metodă optimă de extracție a antocianilor din cojile de vinete.

8.4.6. Capacitatea extractelor din cojile de vinete de inhibare *in vitro* a enzimelor

Niveluri medii (~ 50 %) de inhibiție pentru toate cele trei enzime au fost remarcate în extractul din coji de vinete. Cu toate acestea, așa cum era de așteptat, procentul de inhibare a enzimelor a crescut odată cu concentrația de compuși bioactivi (**figura 8.2**). În cazul inhibării LOX și lipazei nu a existat nicio diferență semnificativă între extractele cu concentrații de 0,1 mg/mL și 0,5 mg/mL ($p > 0,05$). În plus, nu a existat nicio diferență semnificativă în efectele inhibitoare ale extractelor din coji de vinete de 0,5 mg/mL și 1 mg/mL asupra amilazei ($p > 0,05$).

Compușii din cojile de vinete au arătat un efect de inhibiție semnificativ mai mare asupra α -amilazei în comparație cu celelalte enzime ($p < 0,05$). Cel mai scăzut efect inhibitor a fost observat asupra lipazei cu valori de aproximativ 20 % pentru toate concentrațiile testate (**figura 8.2**).

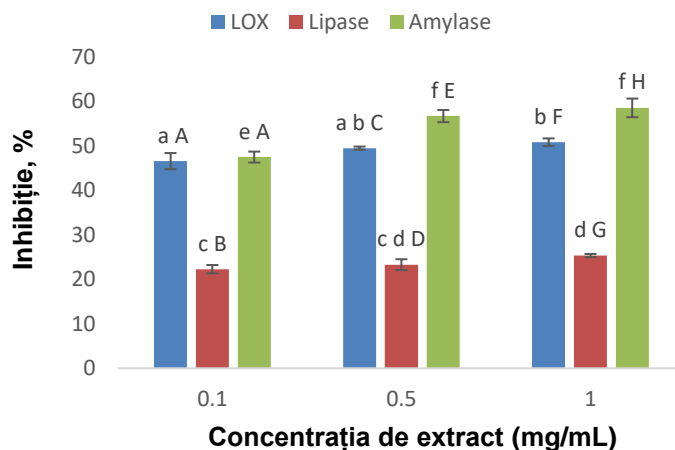


Figura 8.2. Procentul de inhibiție enzimatică de 0,1 – 1 mg/mL extract de coajă de vinete. Literele mici evidențiază diferențele de inhibiție dintre concentrații. Literele mari evidențiază diferențele de inhibiție dintre enzime. Valorile care împărtășesc o literă nu sunt semnificativ diferite ($p>0,05$)

8.4.7. Digestibilitatea *in vitro* a antocianilor din cojile de vinete

În studiul nostru, extractul a fost supus sucurilor gastrice și intestinale simulate *in vitro* pentru a înțelege cum se comportă antocianii din cojile de vinete în condiții gastrointestinale. Rezultatele sunt ilustrate în **figura 8.3**.

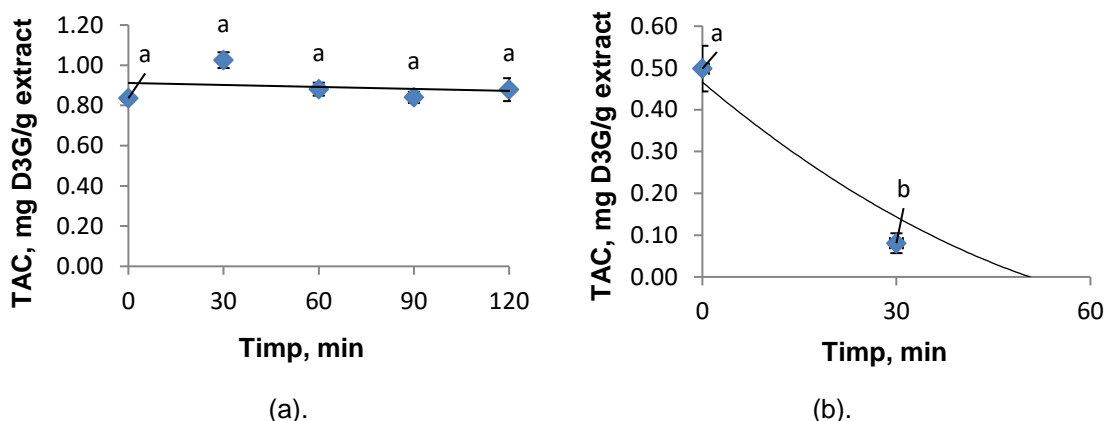


Figura 8.3. Comportamentul antocianilor sub digestia gastrică (a) și intestinală (b) simulată *in vitro*. Variația CTA în timp a fost evidențiată cu litere mici. Valorile care au o literă mică nu sunt semnificativ diferite ($p>0,05$)

Deoarece antocianii sunt compuși sensibili la pH, stabili la valori scăzute ale acestuia, în condițiile gastrice simulate, unde pH-ul setat a fost 3,0, antocianii din extractul din cojile de vinete au fost stabili. **Figura 8.3a** ilustrează faptul că, pe parcursul celor 120 de min de digestie, nu s-au găsit diferențe semnificative între concentrațiile de antociani analizate ($p>0,05$). Dacă în sistemul gastric simulat antocianii au avut o stabilitate crescută, în sistemul intestinal simulat, unde pH-ul a crescut până la 7,0, s-a produs o degradare semnificativă ($p<0,05$) a acestora. Din **figura 8.3b** se poate observa faptul că nu s-au mai putut identifica spectrofotometric antociani după 60 de min de digestie.

8.4.8. Cinetica degradării termice a antocianilor din cojile de vinete

În studiul nostru, extractul din coji de vinete a fost tratat termic la diferite combinații de temperatură-timp pentru a evalua comportamentul antocianilor. Au fost luate în considerare condițiile specifice de pasteurizare, sterilizare și chiar de coacere.

O scădere progresivă a CTA a fost observată pe întregul interval de temperatură investigat (figura 8.4).

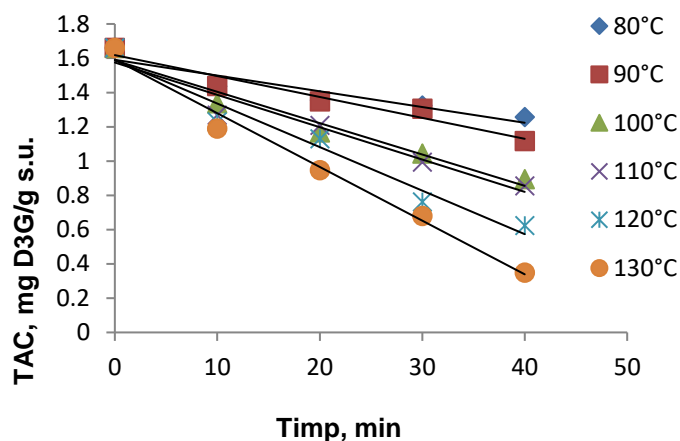


Figura 8.4. Degradarea termică a antocianilor din extractul de coji de vinete tratat la diferite temperaturi

Figura 8.4 subliniază o creștere a degradării antocianilor odată cu creșterea timpului și a temperaturii. Astfel, la 80 °C, 14 % din CAT s-a degradat după primele 10 min de tratament termic, atingând o degradare de 25 % după 40 min. La 130 °C, pe de altă parte, a fost observată o accelerare a degradării antocianilor. În primele 10 min de tratament termic, 28% din CAT au fost degradată, ajungând la 77% după 40 de min.

Parametrii cinetici țintă în acest studiu au fost constanta vitezei de degradare (k), timpul de înjumătățire ($t_{1/2}$) și energia de activare (E_a). Astfel, modelul cinetic de ordinul întâi a fost utilizat pentru a calcula parametrii cinetici pentru degradarea antocianilor din cojile de vinete. **Tabelul 8.19** prezintă valorile acestor parametri.

Tabel 8.19. Parametri cinetici ai antocianilor din extractul de coajă de vinete tratați la diferite temperaturi

Temperatura, °C	$k \cdot 10^{-2} (\text{min}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{min})$	$E_a (\text{kJ/mol})$
80	$0,74 \pm 0,001$	$93,66 \pm 1,05$	$34,63 \pm 3,59$
90	$0,79 \pm 0,004$	$87,74 \pm 0,78$	
100	$1,53 \pm 0,002$	$45,30 \pm 0,44$	
110	$1,59 \pm 0,001$	$43,59 \pm 4,84$	
120	$2,42 \pm 0,003$	$28,64 \pm 0,33$	
130	$2,91 \pm 0,01$	$23,81 \pm 0,71$	

Tabelul 8.19 sugerează faptul că parametrul k crește pe măsură ce temperatura crește. Procesarea termică determină degradarea antocianilor din cauza proceselor de oxidare. Antocianii sau zaharurile lor conjugate se descompun în molecule mici cum ar fi aldehidele și derivații de acid benzoic atunci când sunt încălzite.

Valorile timpului de înjumătățire s-au redus odată cu creșterea temperaturii, iar energia de activare a fost de 39,87 kJ/mol (**tabelul 8.19**), ceea ce indică faptul că antocianii au fost dependenți de temperatură (**figura 8.5**).

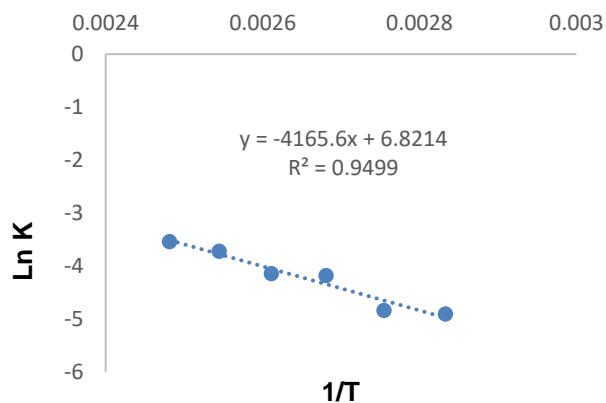


Figura 8.5. Grăful Arrhenius pentru dependența lui k față de temperatură

Parametrii termodinamici de interes au fost entalpia de activare (ΔH), energia liberă Gibbs de inactivare (ΔG) și entropia de activare (ΔS). Valorile calculate ale acestor parametri sunt detaliate în **tabelul 8.20**.

Tabel 8.20. Parametrii termodinamici ai antocianilor din extractul din coji de vinete tratat la diferite temperaturi

Temperatura, °C	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	ΔS (J·mol ⁻¹ × K ⁻¹)
80	31,69 ± 1,03	113,36 ± 9,56	-231,34 ± 11,05
90	31,61 ± 0,40	116,46 ± 11,61	-233,74 ± 18,80
100	31,53 ± 1,20	117,70 ± 10,98	-231,08 ± 15,21
110	31,44 ± 1,10	120,82 ± 9,03	-233,35 ± 11,55
120	31,36 ± 3,01	122,68 ± 9,43	-232,37 ± 15,13
130	31,28 ± 0,10	125,27 ± 11,26	-233,23 ± 17,01

Valorile ΔH calculate (**Tabelul 8.20**) au fost pozitive și, de asemenea, similare în ciuda creșterii temperaturii. Valorile ΔG au fost de asemenea pozitive pentru toate temperaturile, în timp ce valorile ΔS au fost negative. Toate aceste valori ale parametrilor termodinamici sugerează faptul că moleculele au fost mai organizate în starea de tranziție decât la începutul reacției, procesul de degradare termică fiind ireversibil. În plus, degradarea compușilor bioactivi a fost o reacție endotermă și nespontană.

8.5. Concluzii parțiale

Scopul acestui studiu a fost de a extrage componentele biologice active din cojile de vinete și de a determina cea mai bună abordare și parametrii optimi pentru obținerea celei mai mari concentrații de antociani posibile. Extracțiile au fost efectuate folosind patru metode diferite: convențională, asistată cu ultrasunete, asistată cu microunde și asistată cu enzime. Au fost de asemenea variate acidul, timpul, temperatura și concentrația de etanol. Rezultatele au permis elaborarea următoarelor concluzii parțiale:

- Cea mai mare concentrație totală de antociani pentru metoda convențională a fost generată cu 96 % etanol și HCl ($1,13 \pm 0,10$ mg D3G/g s.u. după 60 min la 50 °C).
- Tehnica asistată cu ultrasunete a condus la cea mai mare concentrație totală de antociani folosind 96 % etanol și HCl ($1,04 \pm 0,10$ mg D3G/g s.u. după 30 min la 25 °C).
- Cu extracția asistată cu microunde, s-a obținut cea mai mare concentrație totală de antociani folosind 70 % etanol și HCl ($0,95 \pm 0,09$ mg D3G/g s.u. după 10 sec).
- Cu toate acestea, datorită toxicității HCl, ceilalți acizi sunt de preferat în locul acestuia.

- Metoda asistată de enzime a atins $0,29 \pm 0,02$ mg D3G/g s.u. ca fiind cea mai mare concentrație totală de antociani, folosind celuloză timp de 1 oră.
- Cele mai scăzute concentrații totale de antociani au fost dobândite cu 96 % etanol și CH_3COOH pentru metodele convenționale, asistate cu ultrasunete și asistate cu microunde, în timp ce pentru metoda asistată cu enzime nu au fost detectați antociani după utilizarea amestecului de enzime pectolitice.
- Comparând metoda asistată cu ultrasunete cu cea convențională, se poate concluziona că aceasta din urmă a permis generarea concentrațiilor maxime de antociani după 30 min la 25°C , folosind CH_3COOH amestecat cu 50 % etanol. De aceea, acest extract a fost folosit în continuare în experimentele noastre.
- Fiecare combinație de parametri a eliberat compuși biologic activi în mod diferit. Cu toate acestea, indiferent de timpul și temperatura utilizată, cele mai scăzute rezultate au fost obținute când s-au folosit 96 % etanol și CH_3COOH pentru toate procedurile.
- În urma analizei cromatografice au fost identificați cinci antociani în toate extractele analizate, cel majoritar fiind delfinidin 3-O-rutinozid.
- Comportamentul antocianilor din cojile de vinete în timpul digestiei gastro-intestinale a fost urmărit folosind o metodă simulată *in vitro*. Astfel, antocianii au fost stabili în timpul digestiei gastrice, în timp ce după 60 de min de digestie intestinală s-au degradat complet.
- În urma tratamentului termic în intervalul de temperatură $25 - 130^\circ\text{C}$ s-a observat o degradare treptată a antocianilor din extract pe măsură ce temperatura și timpul au crescut. Astfel, după 40 de minute de tratament termic la 130°C , aproximativ 77% din antociani au fost degradați. Parametrii de degradare a antocianilor au fost calculați folosind modelul cinetic de ordinul întâi. Astfel, rata de degradare, timpul de înjumătățire și energia de activare permit o predicție precisă a degradării termice a antocianilor. Parametrii termodinamici au demonstrat că o creștere a temperaturii a accelerat efectul de degradare, permițându-ne să concluzionăm faptul că antocianii au o dependență crescută față de temperatură.

CAPITOLUL 9. HIDROLIZA PROTEINELOR DIN ZER

9.2. Obiectivele studiului

Acest studiu a avut ca scop extragerea peptidelor din proteinele din zer prin hidroliză enzimatică. Obiectivele principale ale acestui studiu au fost:

- varierea enzimelor de hidroliză pentru a produce hidrolizate proteice cu grade cât mai mari de hidroliză;
- caracterizarea hidrolizatelor proteice obținute în ceea ce privește gradul de hidroliză și activitatea antioxidantă;
- testarea efectului prebiotic al hidrolizatelor proteice.

9.4. Rezultate și discuții

9.4.1. Caracterizarea hidrolizatelor proteice

Tabelul 9.1 prezintă valorile GH și activității antioxidante ale hidrolizatelor proteice. Cel mai ridicat GH a fost atins pentru Hp care a folosit β -Lg ca substrat și termolizină, așa cum este raportat în tabelul 9.1. Cel mai scăzut grad de hidroliză a fost observat pentru Hp care a folosit IPZ ca substrat și chimotripsină pentru ruperea lanțurilor polipeptidice. Deși au existat diferențe în ceea ce privește gradele de hidroliză, s-a observat o diferență foarte mică în ceea ce privește activitatea antioxidantă. În ciuda GH ridicat, activitatea de captare a DPPH a fost scăzută.

Tabel 9.1. Caracteristicile hidrolizatelor proteice

Hidrolizat proteic	Enzimă	Substrat	Raport E/S	Timp hidroliză (h)	GH (%)	Capacitate de scindare a DPPH (μ M TE/g proteină)
Hp(T)	Thermolizină	IPZ	1:1000	6	18,73	$4,44 \pm 0,47^b$
Hp(β -LgT)	Thermolizină	β -Lg	1:50	2	20,68	$41,77 \pm 4,08^a$
Hp(CT)	Chimotripsină	IPZ	1:50	2	9,32	$5,28 \pm 0,34^b$
Hp(LFCT)	Chimotripsină	LF	1:50	2 ½	14,41	$1,74 \pm 0,12^b$

Pentru hidroliza IPZ-ului folosind protează, au fost utilizate mai multe rapoarte enzimă/substrat pentru a atinge cel mai mare grad de hidroliză. GH-ul dobândit este ilustrat în **figura 9.4**.

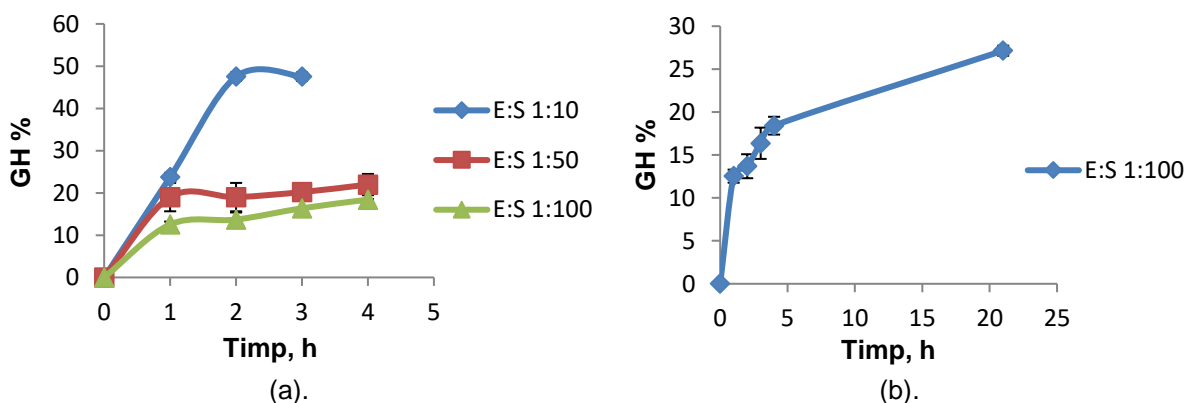


Figura 9.4. Grade de hidroliză obținute după hidroliza enzimatică a IPZ cu protează în diferite rapoarte enzimice:substrat

Figura 9.4a arată că pentru cele trei rapoarte enzimă/substrat, GH a crescut cu timpul, dar a scăzut odată cu creșterea masei substratului. În primele 60 min de hidroliză, GH a crescut rapid în toate cele trei hidrolize, ca mai apoi creșterea să aibă loc lent (în ceea ce privește ultimele două rapoarte). După 2 ore de hidroliză s-a înregistrat un GH maxim de 47,51

$\pm 1,00$ % cu raportul de 1:10. Deși procesul de hidroliză a continuat încă o oră, GH-ul a rămas același, dar hidrolizatele au devenit foarte amare datorită eliberării de peptide mici și aminoacizi. Raportul de 1:50 a afișat o creștere mult mai mică și mai lentă a GH decât cea raportată anterior. Astfel, după 4 ore de hidroliză, GH a fost de $21,91 \pm 2,51$ %. Cele mai scăzute grade de hidroliză au fost observate la un raport de 1:100 enzimă/substrat. În acest caz, GH a crescut mai lent, ajungând la $18,41 \pm 1,03$ % după 4 ore. Cu toate acestea, după 21 de ore de hidroliză (**figura 9.4 b**), GH a crescut la $27,14 \pm 0,58$ %.

În studiul nostru, activitatea antioxidantă a hidrolizatului cu protează a fost determinată folosind atât DPPH, cât și ABTS ca radicali liberi. La evaluarea activității antioxidante asupra DPPH, a fost observat un efect antioxidant de $3,97 \pm 0,35$ $\mu\text{M ET/g s.u.}$, în timp ce asupra ABTS de $17,38 \pm 0,02$ $\mu\text{M ET/g s.u.}$

9.4.2. Efectul prebiotic al hidrolizatelor proteice

Efectul prebiotic Hp(P) a fost analizat la o concentrație de 2 % hidrolizat, asupra tulpinii probiotice de *L. paracasei*, în timpul fermentației *in vitro* (48 ore, la 37 °C) și depozitării (după 7, 14 și 21 de zile la 4 °C) (**tabel 9.2**).

Tabel 9.2. Efectul prebiotic al hidrolizatelor (2 %) asupra *L. paracasei*

Proba	Efect prebiotic (log UFC/mL)			
	*	**	***	****
Control	1	1	1	1
Hp(P)	$1,36 \pm 0,01$	$1,31 \pm 0,05$	$1,27 \pm 0,07$	$1,27 \pm 0,03$

* Fermentare (48 h, 37 °C); ** 7 zile de depozitare; ***14 zile de depozitare; ****21 zile de depozitare

Rezultatele au demonstrat că tulpina probiotică comercială a fost capabilă să crească în mediul MRS suplimentat cu 2 % hidrolizate. După 48 de ore de fermentație lactică s-a demonstrat efectul prebiotic. Efectul prebiotic a scăzut ușor în perioada de păstrare, conform datelor de la **Tabel 9.2**. Un indice prebiotic mai mare de 1,0 înseamnă că hidrolizatele influențează pozitiv dezvoltarea probioticelor.

9.5. Concluzii parțiale

În acest studiu au fost examinate diverse enzime pentru a obține hidrolizate proteice din diferite substraturi, cu un grad ridicat de hidroliză. Astfel, proteinele din zer, β -lactoglobulina și lactoferina au fost clivate cu termolizina, chimotripsină și protează. Rezultatele au permis elaborarea următoarelor concluzii parțiale:

- Au fost testate diverse rapoarte enzimă/substrat, gradul de hidroliză având valori cuprinse între 9,32 % și 47,51 %.
- În ciuda gradului ridicat de hidroliză, activitățile antioxidante au fost scăzute.
- Odată cu creșterea raportului substrat-enzimă, hidroliza proteinelor cu protează a avut loc mai lent. În același timp, gradul de hidroliză a crescut odată cu timpul.
- Activitatea antioxidantă a hidrolizatului proteic obținut cu protează a crescut odată cu timpul și raportul enzimă-substrat.
- Hidrolizatului proteic obținut cu protează după 21 de ore de hidroliză a prezentat un efect prebiotic asupra tulpinii comerciale de bacterii *L. paracasei*.

CAPITOLUL 10. STUDII PRIVIND LEGAREA ȘI STINGEREA FLUORESCENȚEI PROTEINELOR ȘI PEPTIDELOR DIN ZER PRIN ADAOSUL DE COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI DIN COJI DE VINETE

10.2. Obiectivele studiului

Acest studiu a avut ca scop evaluarea mecanismului de legare dintre proteinele și peptidele din zer și compușii bioactivi din cojile de vinete. Astfel, obiectivele acestui studiu au fost de a:

- investiga interacțiunea dintre β -Lg, LF, IPZ, peptide și antocianii din cojile de vinete în intervalul de temperatură de 25–100 °C, având în vedere importanța tratamentului termic în industria alimentară;
- calcula parametrii de legare și termodinamici și a aproxima principalele forțe implicate în proces.

10.4. Rezultate și discuții

10.4.1. Stingerea fluorescenței β -Lg

Figura 10.1 ilustrează modificările spectrelor de emisie ale proteinei tratate la diferite temperaturi pe măsură ce concentrația de extract a crescut.

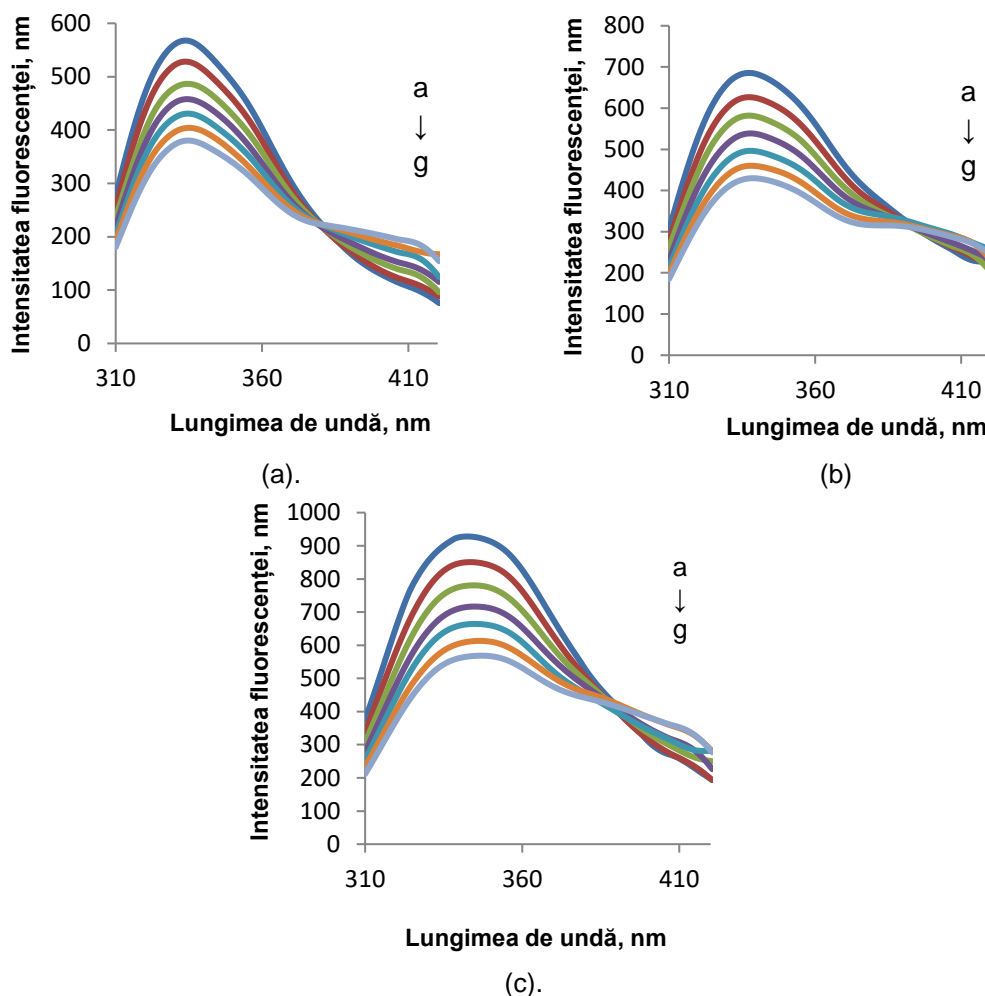


Figura 10.1. Spectrele de fluorescență ale interacțiunii dintre β -Lg tratată termic la 25 °C (a), 70 °C (b) și 100 °C (c) și antocianii din cojile de vinete în concentrații de la 0 la 7.02×10^{-7} mol D3G (a→g)

Figura 10.1 arată că intensitatea fluorescenței β -Lg scade pe măsură ce concentrația de extract crește. La nivel molecular, au apărut transferul de energie și interacțiunile de legare între antociani și proteine și au condus la modificări ale polarității mediului în jurul resturilor de Trp prezente în lanțurile polipeptidice. La 25 °C, antocianii au stins 33% din fluorescența inițială a proteinei (**figura 10.1 a**). Pe măsură ce temperatura a crescut, a apărut și o creștere a efectului de stingere a intensității fluorescenței (**figura 10.1 b, c**).

Pentru a prezice mecanismul de stingere a fluorescenței (static sau de coliziune), parametrii de legare (**tabelul 10.1**) au fost calculați pornind de la ecuația Stern-Volmer.

Tabel 10.1. Parametrii de legare dintre β -Lg tratată termic în intervalul de temperatură 25 °C - 100 °C și antocianii din cojile de vinete

Temperatura (°C)	Ksv $\times 10^4$ (L \times mol ⁻¹)	Kb $\times 10^6$ (L \times mol ⁻¹)	n
25	73,96 \pm 9,92 ^a	9,74 \pm 0,46 ^b	0,91 \pm 0,02 ^c
50	74,90 \pm 7,75 ^a	9,58 \pm 0,22 ^b	0,90 \pm 0,04 ^c
60	79,66 \pm 4,47 ^a	9,23 \pm 0,54 ^b	0,89 \pm 0,04 ^c
70	84,70 \pm 2,36 ^a	8,83 \pm 0,33 ^b	0,88 \pm 0,02 ^c
80	86,30 \pm 2,22 ^a	9,57 \pm 0,57 ^b	0,96 \pm 0,06 ^c
90	87,60 \pm 7,25 ^a	10,56 \pm 1,42 ^b	1,06 \pm 0,16 ^c
100	87,65 \pm 2,89 ^a	10,61 \pm 1,84 ^b	0,90 \pm 0,04 ^c

Influența temperaturii a fost evidențiată cu litere mici pe coloană. Valorile care au o literă mică pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$)

Valorile Ksv au prezentat o ușoară creștere, însă nesemnificativă, odată cu temperatura ($p > 0,05$), ceea ce indică faptul că la nivel molecular a avut loc un transfer de energie scăzut, procesul fiind static (**tabel 10.1**). Valorile Kb au scăzut ușor odată cu creșterea temperaturii până la 70 °C, apoi au crescut cu temperatura până la 100 °C. Același comportament a fost urmat de numărul de situsuri de legare. Cu toate acestea, nu au fost observate diferențe semnificative din punct de vedere statistic ($p > 0,05$). Acest fenomen este cunoscut sub denumirea de diagrama „break-in Arrhenius” și se datorează suprapunerii forțelor implicate în procesul de legare dintre proteine și antociani în jurul temperaturii de 70 °C.

Tabel 10.2 prezintă parametrii termodinamici, iar aceștia permit înțelegerea tipului de forțe implicate în mecanismul de legare a β -Lg cu antocianii.

Tabel 10.2. Parametrii termodinamici de legare dintre β -Lg tratat termic în intervalul de temperatură 25 °C - 100 °C și antocianii din cojile de vinete

Temperatura (°K)	ΔH (J/mol)	ΔS (J/mol \times K)	ΔG (J/mol)
298			-71,72
323			-103,72
333	309,72	1,28	-116,52
343			-129,32
353			-3450,86
363	-1325,8	6,02	-3511,06
373			-3571,26

Pentru complexul format între β -Lg și antociani din cojile vinetelor, entalpia și entropia au fost estimate în două intervale de temperatură și anume 25-70 °C și 70-100 °C. Valorile celor doi parametri termodinamici permit aprecierea faptului că în procesul de legare, în intervalul de temperatură 25-70 °C, au fost implicate forțe hidrofobe ($\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$), în timp ce în intervalul 70-100 °C au fost interacțiuni electrostatice ($\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$). Variația energiei libere a prezentat, de asemenea, valori negative, indicând faptul că reacția de legare a avut loc spontan și a fost dominată de entalpie.

10.4.2. Stingerea fluorescenței Lf

Figura 10.3 ilustrează modificări ale spectrelor de emisie ale Lf pe măsură ce concentrația extractului, temperatura și timpul de tratament termic au crescut.

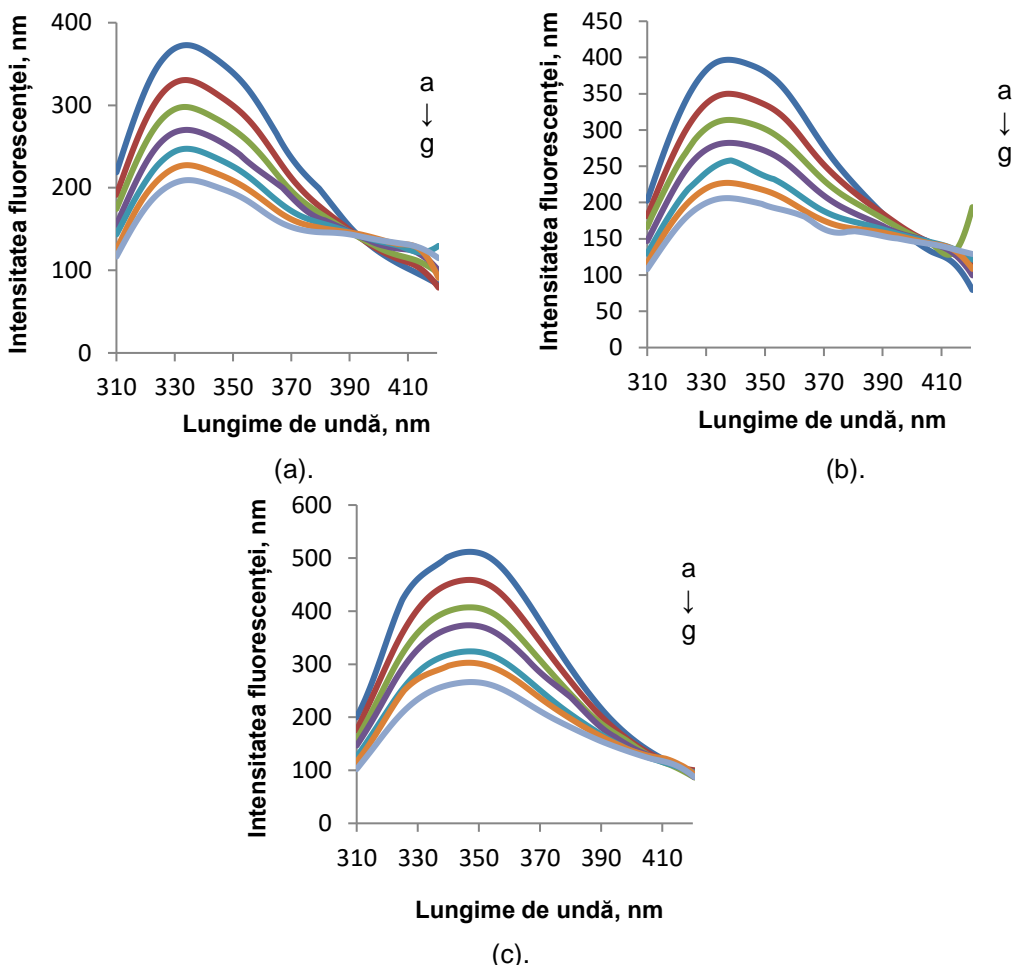


Figura 10.3. Spectrele de fluorescență ale interacțiunii dintre Lf tratat termic la 25 °C (a), 60 °C (b) și 80 °C (c) și antocianii din cojile de vinete într-o concentrație de 0 până la 7.03×10^{-7} mol D3G (a→g)

O scădere treptată a intensității fluorescenței a fost observată pe măsură ce concentrația extractului a crescut. Astfel, la 25 °C, antocianii au stins 44% din intensitatea fluorescenței LF și la 60 °C și 80 °C în proporție de 48%. Efectul de stingere a crescut odată cu creșterea temperaturii.

Parametrii de legare ai antocianilor la Lf sunt detaliați în **tabel 10.3**.

Tabel 10.3. Parametrii de legare între Lf tratată termic în intervalul de temperatură de la 25 °C la 80 °C și antocianii din coji de vinete

Temperatura (°C)	$K_{sv} \times 10^4$ (L \times mol ⁻¹)	$K_b \times 10^5$ (L \times mol ⁻¹)	n
25	106,43 \pm 9,12 ^a	80,29 \pm 4,47 ^b	0,88 \pm 0,03 ^c
50	110,13 \pm 3,32 ^a	80,74 \pm 1,42 ^b	0,91 \pm 0,05 ^{bc}
60	117,13 \pm 7,42 ^a	83,08 \pm 6,19 ^b	0,97 \pm 0,03 ^{abc}
70	130,19 \pm 6,29 ^a	83,77 \pm 7,47 ^b	1,01 \pm 0,01 ^{ab}
80	134,95 \pm 7,84 ^a	84,57 \pm 3,37 ^b	1,02 \pm 0,03 ^a

Influența temperaturii a fost evidențiată cu litere mici pe o coloană. Valorile care au o literă mică pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$) conform testului ANOVA.

Creșterea temperaturii a dus la o ușoară creștere a valorilor K_{sv} (**tabelul 10.3**), indicând un transfer de energie scăzut între Trp și moleculele de antociani, specific unui proces static. Valorile k_b au crescut ușor odată cu temperatura, dar nu a existat o influență semnificativă a

temperaturii asupra acestei constante ($p > 0,05$). Valorile parametrului n au crescut semnificativ ($p < 0,05$) odată cu creșterea temperaturii, Lf având cel puțin un situs cu afinitate mare de legare pentru antociani.

Tabel 10.4. Parametrii termodinamici dintre LF tratat termic de la 25 °C la 80 °C și antocianii din cojile vinetelor

Temperatura (°K)	ΔH (J/mol)	ΔS (J/mol \times K)	ΔG (J/mol)
298			-1791,65
323			-1920,65
333	-253,97	5,16	-1972,25
343			-2023,85
353			-2075,45

După calcularea parametrilor termodinamici (**tabelul 10.4**), a rezultat un ΔH de -253,91 J/mol și ΔS de 5,16 J/mol \times K. Aceste valori indică faptul că interacțiunile electrostatice au fost implicate în mecanismul de legare. În același timp, indică faptul că reacția dintre molecule a fost exotermă. ΔG a avut valori negative, ceea ce înseamnă că procesul de legare a avut loc spontan de la dreapta la stânga, cu entalpia dominantă.

10.4.3. Stingerea fluorescenței proteinelor din zer

Figura 10.5 afișează modificările spectrelor de emisie ale soluției de IPZ pe măsură ce concentrația extractului din coji de vinete a crescut.

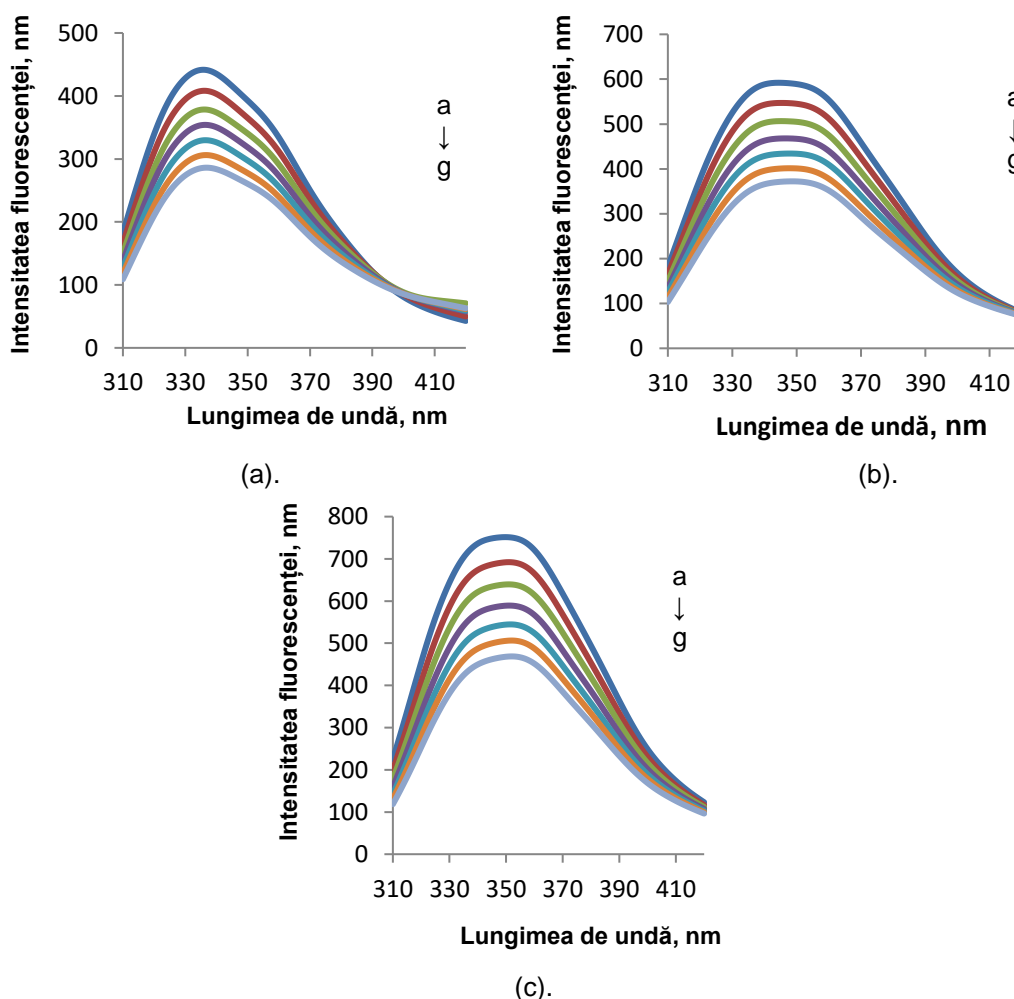


Figura 10.5. Spectrele de fluorescență ale interacțiunii dintre IPZ tratat termic la 25 °C (a), 70 °C (b) și 90 °C (c) și antocianii din cojile de vinete într-o concentrație de 0 până la $8,47 \times 10^{-7}$ mol D3G (a→g)

La 25 °C, antocianii din extractul de coji de vinete au stins 35 % din fluorescența inițială a proteinelor. Odată cu creșterea temperaturii, s-a observat o creștere a efectului de stingere a fluorescenței de către antociani, ajungând la 38 % în cazul tratamentului termic al proteinei la 90 °C. Aceste modificări indică faptul că între antocianii din cojile vinetelor și proteinele zerului apar interacțiuni de legare și transfer de energie.

Parametrii de legare indicați în **tabelul 10.5** au fost determinați pentru a putea prezice mecanismul de stingere a fluorescenței.

Tabel 10.5. Parametrii de legare între IPZ tratat termic în intervalul de temperatură de la 25 °C la 90 °C și antocianii din cojile de vinete

Temperatura (°C)	Ksv × 10 ⁴ (L × mol ⁻¹)	Kb × 10 ⁶ (L × mol ⁻¹)	n
25	66,40 ± 3,67 ^a	9,83 ± 0,59 ^b	0,87 ± 0,07 ^c
50	68,45 ± 1,30 ^a	9,87 ± 0,47 ^b	0,89 ± 0,04 ^c
60	68,80 ± 5,52 ^a	10,01 ± 0,09 ^b	0,91 ± 0,04 ^c
70	71,00 ± 3,04 ^a	9,75 ± 0,27 ^b	0,89 ± 0,01 ^c
80	73,10 ± 3,14 ^a	9,55 ± 0,19 ^b	0,89 ± 0,01 ^c
90	79,90 ± 0,56 ^a	9,02 ± 0,11 ^b	0,88 ± 0,02 ^c

Influența temperaturii a fost evidențiată cu litere mici pe o coloană. Valorile care au o literă mică pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$) conform testului ANOVA.

Creșterea temperaturii a dus la o ușoară creștere a valorii Ksv (**tabelul 10.5**), specifică unui proces static, indicând un transfer de energie scăzut între Trp și moleculele de antociani. Valorile kb au crescut ușor odată cu temperatura până la 60 °C și apoi au scăzut ușor odată cu creșterea temperaturii. Acest fenomen se numește diagrama „break-in Arrhenius” datorită reacției β-Lg (găsită în cel mai mare procent în IPZ) la tratamentul termic.

Tabelul 10.6 prezintă valorile entalpiei și entropiei estimate pentru interacțiunea dintre IPZ tratat termic și antociani în două intervale de temperatură, și anume 25-60 °C și 70-90 °C.

Tabel 10.6. Parametrii termodinamici de legare între IPZ tratat termic de la 25 °C la 90 °C și antocianii din cojile de vinete

Temperatura (°K)	ΔH (J/mol)	ΔS (J/mol × K)	ΔG (J/mol)
298			-908,53
323	-118,83	2,65	-974,78
333			-1001,28
343			-209,31
353	284,61	1,44	-223,71
363			-238,11

Valorile pentru cei doi parametri termodinamici demonstrează că atât interacțiunile electrostatice ($\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$) cât și forțele hidrofobe ($\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$) au fost implicate în procesul de legare (**tabelul 10.6**). În același timp, valorile ΔG au fost negative în cele două intervale de temperatură, și anume 25-60 °C și 70-90 °C, sugerând că reacția de legare a avut loc spontan și aproape complet, fiind dominată de entalpie mai mult decât de entropie.

10.4.4. Stingerea fluorescenței peptidelor din zer

Figura 10.7 ilustrează spectrele de fluorescență ale peptidelor tratate termic la diferite temperaturi, titrate cu un extract din coji de vinete.

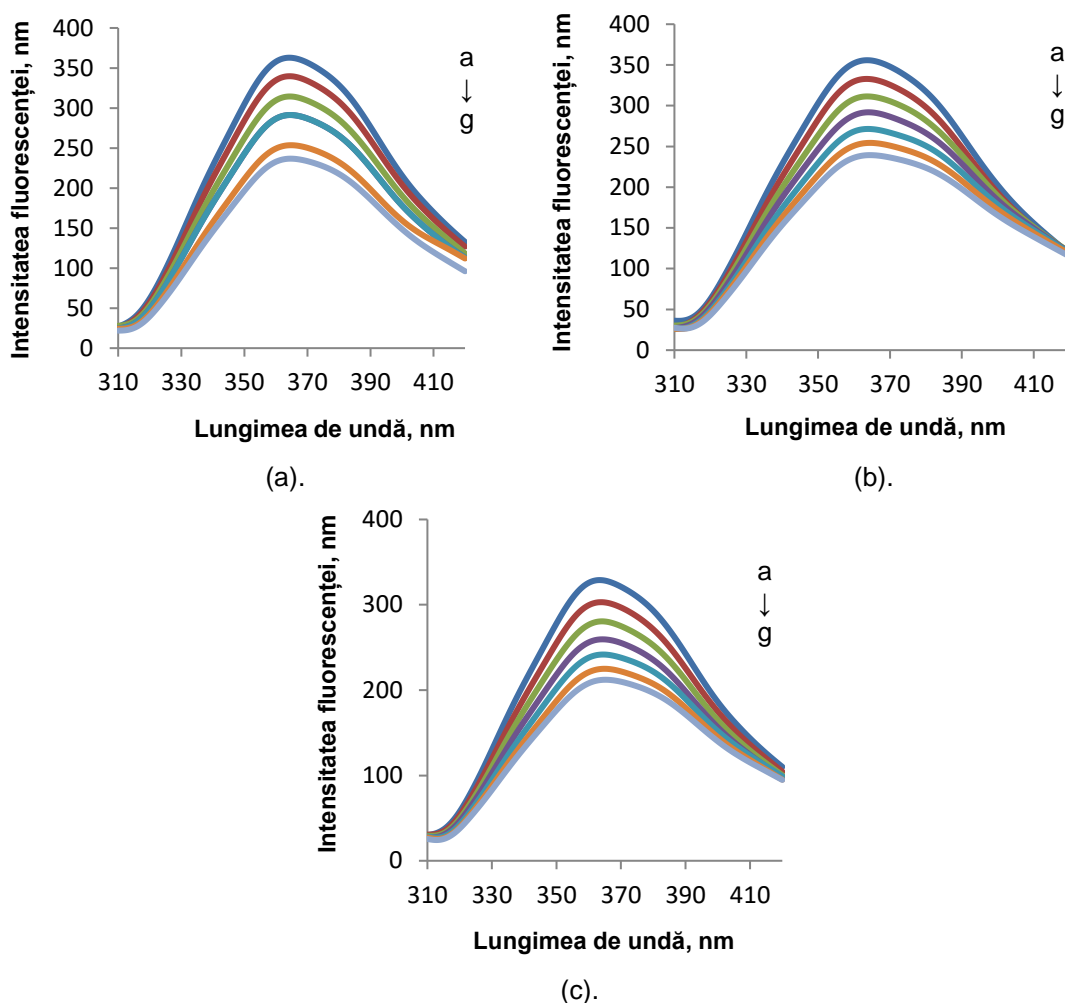


Figura 10.7. Spectrele de fluorescență ale interacțiunii dintre Hp(P) 3 Da tratat termic la 25 °C (a), 70 °C (b) și 100 °C (c) și antociani din cojile de vinete într-o concentrație de 0 până la 8.48×10^{-7} mol D3G (a→g)

La 25 °C, antocianii din extractul de coji de vinete au stins 29% din fluorescența inițială a peptidelor. Pe măsură ce temperatura a crescut, a fost observată și o creștere a efectului de stingere al fluorescenței de către antocianii din cojile vinetelor. La 70 °C, efectul de stingere a fluorescenței a fost de 33 %, ajungând la 36 % în cazul tratamentului termic al peptidelor la 100 °C. Acest lucru indică faptul că un proces de legare și transfer de energie a avut loc între antociani din cojile vinetelor și peptide.

Tabelul 10.7 detaliază valorile parametrilor de legare dintre Hp(P) tratat termic în intervalul de temperatură de la 25 °C la 100 °C și antociani din coaja de vinete.

Tabel 10.7. Parametrii de legare între Hp(P) tratat termic în intervalul de temperatură de la 25 °C la 100 °C și antocianii din cojile de vinete

Temperatura (°C)	$K_{sv} \times 10^4$ (L \times mol ⁻¹)	$K_b \times 10^6$ (L \times mol ⁻¹)	n
25	60,63 \pm 2,07 ^a	10,73 \pm 0,27 ^a	0,93 \pm 0,02 ^b
50	61,73 \pm 2,25 ^a	10,21 \pm 0,33 ^{ab}	0,88 \pm 0,02 ^b
60	64,10 \pm 4,02 ^a	9,80 \pm 0,10 ^{ab}	0,86 \pm 0,02 ^b
70	72,10 \pm 2,96 ^a	9,56 \pm 0,82 ^{ab}	0,85 \pm 0,04 ^b
80	67,70 \pm 0,56 ^a	9,81 \pm 0,57 ^b	0,87 \pm 0,01 ^b
90	67,33 \pm 4,42 ^a	9,84 \pm 0,18 ^{ab}	0,88 \pm 0,05 ^b
100	64,83 \pm 3,31 ^a	9,93 \pm 0,16 ^{ab}	0,89 \pm 0,04 ^b

Influența temperaturii a fost evidențiată cu litere mici pe o coloană. Valorile care au o literă mică pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$) conform testului ANOVA.

Din **tabelul 10.7** se remarcă o ușoară creștere a valorilor Ksv cu creșterea temperaturii până la 70 °C, indicând un transfer de energie scăzut între reziduurile de Trp și moleculele de antociani, dar și un proces static. În urma tratamentului termic la temperaturi mai ridicate, valorile Ksv au început să scadă. Valorile kb au crescut odată cu temperatura până la 70 °C și apoi au scăzut odată cu creșterea temperaturii. S-a observat faptul că numărul de situsuri de legare a urmat același tipar, indicând existența unei afinități pentru locul de legare a antocianilor din extractul de coji de vinete.

Tabelul 10.8 prezintă parametrii termodinamici estimați pentru interacțiunea dintre Hp(P) tratat termic și antocianii din cojile de vinete.

Tabel 10.8. Parametrii termodinamici de legare între Hp(P) 3 kDa tratat termic în intervalul 25 °C – 100 °C și antocianii din cojile de vinete

Temperatura (°K)	ΔH (J/mol)	ΔS (J/mol × K)	ΔG (J/mol)
298			-187,73
323			-225,23
333	259,17	1,5	-240,23
343			-255,23
353			-1112,65
363	-156,02	2,71	-1139,75
373			-1166,85

În cazul complexului format între peptidele de 3 kDa și antociani, entalpia și entropia au fost estimate în două intervale de temperatură și anume 25-70 °C și 80-100 °C, după cum se poate observa din **tabelul 10.8**. Valorile raportate demonstrează faptul că în procesul de legare au fost implicate forțe hidrofobe pentru primul interval de temperatură, reacția dintre molecule fiind endotermă. În al doilea interval de temperatură au fost implicate forțe electrostatice, reacția fiind exotermă. Variația ΔG a scăzut odată cu temperatura, sugerând că reacția de legare are loc spontan și a fost dominată de entalpie.

10.5. Concluzii parțiale

Rezultatele au permis elaborarea următoarelor concluzii parțiale:

- ✓ Spectroscopia cu fluorescență a arătat că antocianii din cojile vinetelor influențează structura secundară a proteinelor și peptidelor prin legarea de acestea.
- ✓ S-a observat și un proces de legare puternică între proteine/peptide și antociani la anumite temperaturi.
- ✓ Forțele hidrofobe la temperaturi scăzute și interacțiunile electrostatice la temperaturi mai ridicate au participat la procesul de legare între antociani din extractul de coajă de vinete și β -lactoglobulină.
- ✓ Interacțiunile electrostatice au avut loc în interacțiunile dintre antociani și lactoferină.
- ✓ Legarea antocianilor de proteinele din izolatul de proteine din zer s-a bazat pe interacțiuni electrostatice la temperaturi scăzute și forțe hidrofobe la temperaturi ridicate.
- ✓ Între antociani și peptidele rezultate prin hidroliza enzimatică a izolatului proteic din zer cu protează, la temperaturi scăzute au fost implicate forțe hidrofobe, în timp ce la temperaturi peste 80 °C au participat interacțiuni electrostatice.

CAPITOLUL 11. DEZVOLTAREA DE INGREDIENTE FUNCȚIONALE PE BAZĂ DE ANTOCIANI DIN COJILE DE VINETE ȘI PEPTIDE BIOACTIVE DIN ZER

11.2. Obiectivele studiului

Acest studiu a avut ca scop valorificarea antocianilor din cojile de vinete ca potențiale ingrediente funcționale pentru aplicații în industria alimentară. Aceasta a implicat creșterea stabilității și funcționalității antocianilor prin microîncapsularea lor împreună cu peptide bioactive. Scopul final al microîncapsulării a fost de a elibera din matrice componentele astfel încât acestea să fie absorbite eficient în sistemul digestiv uman.

Astfel, obiectivele acestui studiu au fost de a:

- încapsula compușii biologic activi din cojile vinetelor folosind diferite materiale de încapsulare și tehnici;
- analiza fitochimic particulele din punct de vedere al concentrațiilor de antociani, flavonoide și polifenoli, activității antioxidante, eficienței de încapsulare și stabilității compușilor la depozitarea în timp;
- analiza structura morfologică a noilor ingrediente prin tehnici de microscopie confocală cu laser;
- testa funcționalitatea microparticulelor în timpul digestiei simulate *in vitro*.

11.4. Rezultate și discuții

11.4.1. Caracterizarea fitochimică și eficiența încapsulării compușilor din pudre

Caracterizarea fitochimică și eficiența de încapsulare a compușilor din pulberile obținute prin tehnica liofilizării cu variația materialelor de încapsulare

Extractele bogate în antociani au fost microîncapsulate în diferite combinații de CMC, P, Hp și IPZ. Variațiile concentrațiilor de polizaharide și proteine au dus la eficiențe diferite de încapsulare a antocianilor. Eficiența microîncapsulării antocianilor a fost de $98,67 \pm 2,31$ % pentru V2 și $96,64 \pm 0,42$ % pentru V3.

Tabel 11.1. Concentrațiile de substanțe fitochimice în microcapsulele obținute prin varierea materialelor de încapsulare

Proba	CTA ($\mu\text{g D3G/g s.u.}$)	CTF (mg CE/g s.u.)	CTP (mg GAE/g s.u.)	Activitate antioxidantă ($\mu\text{M TE/g s.u.}$)
Extract	$561,56 \pm 8,64$	$2,87 \pm 0,02$	$13,13 \pm 0,81$	$25,70 \pm 0,75$
V2	$392,26 \pm 22,92^b$	$4,15 \pm 0,13^b$	$10,74 \pm 0,70^a$	$36,34 \pm 0,58^a$
V3	$290,95 \pm 3,53^c$	$3,66 \pm 0,54^{ab}$	$12,30 \pm 0,39^b$	$35,42 \pm 0,73^a$

Valorile care au o literă mică pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$) conform testului ANOVA; V2 – CMC + P; V3 – WPI + Hp(P);

Dintre cele trei variante experimentale, cea care a avut doar CMC și P ca agenți de încapsulare a prezentat cea mai mare CTA (**tabelul 11.1**). V2 a avut, de asemenea, cea mai mare concentrație de flavonoide, însă cea mai scăzută concentrație de polifenoli. În ceea ce privește activitatea antioxidantă, nu au existat diferențe semnificative între cele trei pulberi ($p > 0,05$). Rezultatele obținute au fost incluse în cererea de brevet A00532/08.10.2021.

Caracterizarea fitochimică și eficiența de încapsulare a compușilor din pulberile proiectate prin tehnica liofilizării cu variația raportului dintre materialele de încapsulare

Extractul din coji de vinete a fost microîncapsulat în diferite combinații de CMC, P, Hp și IPZ. Variația rapoartelor dintre carbohidrați și proteine a condus la diferite eficiențe de încapsulare. Eficiența microîncapsulării antocianilor a fost de $69,90 \pm 1,90$ % pentru proba martor, $70,03 \pm 2,17$ % pentru I1, $77,60 \pm 1,92$ % pentru I2 și $73,78 \pm 1,71$ % în cazul I3.

Concentrațiile de substanțe fitochimice și activitatea antioxidantă a microparticulelor sunt prezentate în **tabelul 11.2**. Cea mai mare CTA a fost găsită în varianta de control, urmată de I3. Acesta din urmă a afișat, de asemenea, cele mai mari CTF și CTP. Probele I1 și I2 au avut o concentrație mai mică de substanțe fitochimice decât celelalte două. Datorită concentrației mari de compuși biologic activi, proba martor și I3 au prezentat o activitate antioxidantă mai mare de $94,71 \pm 2,57$ $\mu\text{M TE/g dw}$ și $91,31 \pm 0,98$ $\mu\text{M TE/g dw}$ comparativ cu I1 și I2. Prin urmare, o cantitate mai mare de CMC în matricea de încapsulare a crescut retenția de compuși biologic activi ducând astfel la o activitate antioxidantă mai mare.

Tabel 11.2. Concentrația de substanțe fitochimice în microcapsulele proiectate prin variarea raportului dintre materialele de încapsulare

Proba	CTA ($\mu\text{g D3G/g s.u.}$)	CTF (mg EC/g s.u.)	CTP (mg EAG/g s.u.)	Activitate antioxidantă ($\mu\text{M ET/g s.u.}$)
Extract	$580,0 \pm 0,03$	$4,48 \pm 0,80$	$13,64 \pm 0,19$	$157,82 \pm 9,46$
Control	$1250,0 \pm 0,25^a$	$25,50 \pm 0,60^{ab}$	$67,78 \pm 9,29^a$	$94,71 \pm 2,80^a$
I1	$520,0 \pm 0,02^b$	$20,81 \pm 0,96^a$	$62,49 \pm 9,32^a$	$62,45 \pm 2,74^b$
I2	$610,0 \pm 0,01^b$	$23,77 \pm 1,22^{ab}$	$62,07 \pm 0,39^a$	$55,43 \pm 7,17^b$
I3	$890,0 \pm 0,02^{ab}$	$28,67 \pm 1,95^b$	$69,15 \pm 0,60^a$	$64,58 \pm 0,49^b$

Valorile care au o literă mică pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$) conform testelor ANOVA; Control – CMC/P/WPI în 1:1:0.4 ratio, I1 - CMC/P/Hp(T) în 1:1:0.4 ratio; I2 - CMC/P//Hp(T) în 2:1:0.4 ratio; I3 - CMC/P/Hp(T) în 1:2:0.4 ratio;

Caracterizarea fitochimică și eficiența de încapsulare a compușilor din pulberile dezvoltate prin tehnica liofilizării cu variația tipului de hidrolizat proteic

Extractul a fost microîncapsulat folosind CMC și P ca materiale de încapsulare. Peptidele din zer generate cu ajutorul a două enzime distincte au fost, de asemenea, adăugate pentru a îmbunătăți funcționalitatea pulberilor. Variația peptidelor din microcapsule a condus la cele trei variante tehnologice cu eficiențe diferite de încapsulare. Eficiența de microîncapsulare a antocianilor a fost de $88,57 \pm 6,69\%$ la martor, $86,54 \pm 5,20\%$ pentru VCT și $64,12 \pm 5,41\%$ pentru VT.

Concentrațiile de substanțe fitochimice și activitatea antioxidantă a particulelor fine sunt prezentate în **tabelul 11.3**. Cea mai mare CTA a fost găsită pentru VT, urmată de varianta de control. Cea mai mare CTF a fost găsită în proba VT, urmată de VCT. De asemeni, VCT a prezentat cea mai mare CTP, urmată de proba VT. Datorită concentrației mari de antociani, probele martor și VT au prezentat cele mai mari activități antioxidante de $38,62 \pm 3,87$ pM ET/g s.u. și $46,38 \pm 1,28$ pM ET/g s.u. Rezultatele au fost incluse în cererea de brevet OSIM A25042/05.10.2018.

Tabel 11.3. Concentrații de compuși fitochimici din microcapsulele preparate prin variarea tipului de hidrolizat proteic

Proba	CTA ($\mu\text{g D3G/g s.u.}$)	CTF (mg EC/g s.u.)	CTP (mg EAG/g s.u.)	Activitate antioxidantă ($\mu\text{M ET/g s.u.}$)
Extract	340,0 \pm 0,51	13,44 \pm 0,97	19,52 \pm 0,51	157,82 \pm 9,46
Control	110,0 \pm 0,01 ^{ab}	67,74 \pm 1,43 ^a	13,69 \pm 1,10 ^a	38,62 \pm 3,87 ^{ab}
VCT	90,0 \pm 0,01 ^a	74,48 \pm 4,15 ^b	19,82 \pm 3,07 ^b	34,39 \pm 5,69 ^a
VT	130,0 \pm 0,02 ^b	77,46 \pm 0,55 ^b	17,26 \pm 1,29 ^{ab}	46,38 \pm 1,28 ^b

Valorile care au o literă mică pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$) conform testului ANOVA; Control – CMC + P + WPI; VCT – CMC + P + Hp(CT); VT – CMC + P + Hp(T);

Caracterizarea fitochimică și eficiența de încapsulare a compușilor din pulberile dezvoltate prin tehnica liofilizării cu variația tulpinilor de bacterii lactice

Extractul de coji de vinete bogat în antociani a fost microîncapsulat folosind CMC și P. În plus, pentru a crește funcționalitatea, au fost adăugate peptide din zer și diverse tulpini de bacterii lactice. Variația tulpinilor de bacterii în microcapsule a condus la proiectarea a trei variante tehnologice cu eficiențe diferite de încapsulare a antocianilor. Eficiența microîncapsulării antocianilor a fost de $95,76 \pm 0,67\%$ pentru control, $94,85 \pm 0,38\%$ pentru VB și $95,89 \pm 0,38\%$ pentru VBP.

Concentrațiile de substanțe fitochimice și activitatea antioxidantă a pulberilor sunt indicate în **tabelul 11.4**. Cea mai mare CTA a fost observată pentru control, urmată de pudra cu co-cultură. În ceea ce privește concentrația de polifenoli, VBP a prezentat cea mai mare CTP, urmată de VB. Concentrațiile ridicate de antociani din probele martor și VBP au dus la activități antioxidante de $86,55 \pm 0,66 \mu\text{M ET/g s.u.}$ și $85,25 \pm 0,89 \mu\text{M ET/g s.u.}$ Cu toate acestea, așa cum se raportează în **tabelul 11.4**, nu există diferențe semnificative între valorile CTF a celor trei variante experimentale de pudre. Prin urmare, se poate aprecia că tehnica de co-microîncapsulare și compușii utilizați au permis proiectarea de ingrediente cu un conținut ridicat de compuși biologic activi și bacterii lactice, cu o eficiență ridicată de încapsulare. De asemenea, toate variantele au prezentat valori ridicate ale activității antioxidante. Rezultatele au fost incluse în cererea de brevet A00481/01.08.2019.

Tabel 11.4. Concentrațiile de substanțe fitochimice în microcapsulele proiectate prin variarea tulpinii de bacterii lactice

Proba	CTA ($\mu\text{g D3G/g s.u.}$)	CTF (mg EC/g s.u.)	CTP (mg EAG/g s.u.)	Activitate antioxidantă ($\mu\text{M TE/g s.u.}$)	Bacterii lactice (UFC/g s.u.)
Extract	662,40 \pm 13,14	15,11 \pm 0,14	24,15 \pm 0,34	258,04 \pm 0,51	-
Control	360,0 \pm 0,01 ^a	4,33 \pm 0,74 ^a	4,77 \pm 0,26 ^a	86,55 \pm 0,66 ^a	-
VB	270,0 \pm 0,01 ^b	5,02 \pm 0,88 ^a	5,88 \pm 0,72 ^{ab}	73,77 \pm 0,50 ^b	1.96 x 10 ^{8b}
VBP	320,0 \pm 0,01 ^c	4,94 \pm 0,86 ^a	6,34 \pm 0,70 ^b	85,25 \pm 0,89 ^a	1.12 x 10 ^{9a}

Valorile care au o literă mică pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$) conform testului ANOVA; Control – WPI + CMC + P + Hp(β -LgT); VB – WPI + CMC + P + Hp(β -LgT) + *L. bif fermentans*; VBP - VB – WPI + CMC + P + Hp(β -LgT) + *L. bif fermentans* + *L. plantarum* (1:1);

Caracterizarea fitochimică și eficiența de încapsulare a compușilor din pulberile preparate prin tehnica de gelifiere la rece

În urma încapsulării compușilor bioactivi din cojile vinetelor prin gelifiere, s-au obținut eficiențe de încapsulare de $64,68 \pm 0,68 \%$ pentru GV1 și, respectiv, $96,44 \pm 3,43 \%$ pentru GV2. Variația concentrațiilor materialelor de încapsulare a condus la diferențe semnificative ($p > 0,05$) în ceea ce privește eficiența încapsulării antocianilor.

Tabelul 11.5 prezintă concentrațiile de compuși fitochimici din pudrele obținute prin metoda gelifierii. Se observă și în acest caz că cea mai mare CTA se regăsește în varianta tehnologică ce a avut concentrații mai mari de poliglucide decât de proteine. În cazul încapsulării flavonoidelor din extractul din coji de vinete, nu se observă diferențe semnificative între cele două ingrediente obținute ($p > 0,05$). Cea mai mare CTP s-a încapsulat în GV1, tot această variantă de pudră prezentând și cea mai mare activitate antioxidantă.

Tabel 11.5. Concentrația de substanțe fitochimice în microcapsulele produse prin gelifiere

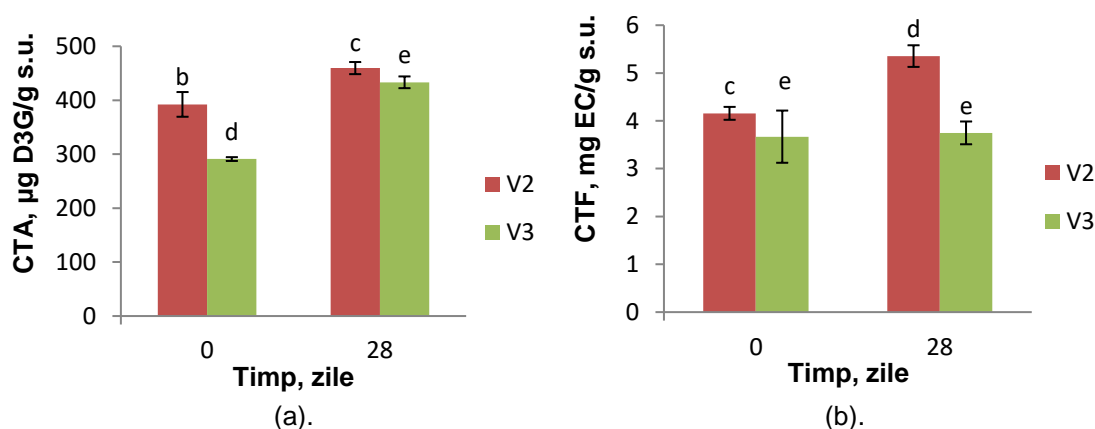
Proba	CTA ($\mu\text{g D3G/g s.u.}$)	CTF (mg EC/g s.u.)	CTP (mg EAG/g s.u.)	Activitate antioxidantă ($\mu\text{M ET/g s.u.}$)
Extract	406,47 \pm 37,41	2,99 \pm 0,12	12,79 \pm 0,66	193,14 \pm 1,25
GV1	50,41 \pm 2,13 ^a	1,53 \pm 0,06 ^a	8,03 \pm 0,18 ^a	41,96 \pm 0,28 ^a
GV2	94,94 \pm 7,94 ^b	1,64 \pm 0,14 ^a	7,22 \pm 0,18 ^b	36,60 \pm 0,83 ^b

Valorile care au o literă mică pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$) conform testului ANOVA; GV1 – CMC/PWPI IN A 1:1:2 ratio; GV2 – CMC/PWPI in a 1:1:0.6;

11.4.2. Stabilitatea la depozitare a compușilor din pudre

Stabilitatea la depozitare a compușilor fitochimici din pulberile concepute prin tehnica liofilizării cu variația materialelor de încapsulare

Modificările în ceea ce privește concentrațiile de compuși biologic activi din ingredientele produse prin varierea materialelor de încapsulare sunt ilustrate graficul din **figura 11.8**. O eliberare semnificativă de CTA din matricea de încapsulare a avut loc după cele 28 de zile de depozitare la 4 °C ($p < 0,05$). Antocianii din matricea de polizaharide au fost eliberați în proporție de 15 %, în timp ce matricea constând numai din proteine a dus la o eliberare de 33 % din CTA (**figura 11.8 a**). O creștere cu 23 % a CTF a fost observată în V2, în timp ce în V3 a prezentat stabilitate (**figura 11.8 b**). S-a observat o bună stabilitate în timp și în cazul polifenolilor pentru V2. În V3 a apărut o creștere de aproximativ 12 % a CTP (**figura 11.8 c**). Eliberarea concentrațiilor de compuși biologic activi din matricea de încapsulare a determinat o creștere a activității antioxidante. Astfel, a existat o creștere semnificativă ($p < 0,05$) a valorilor activității antioxidante împotriva radicalului DPPH pentru ambele pulberi după 14 zile (**figura 11.8 d**). Ulterior, însă, s-a observat o scădere a activității antioxidante ca urmare a degradării compușilor.



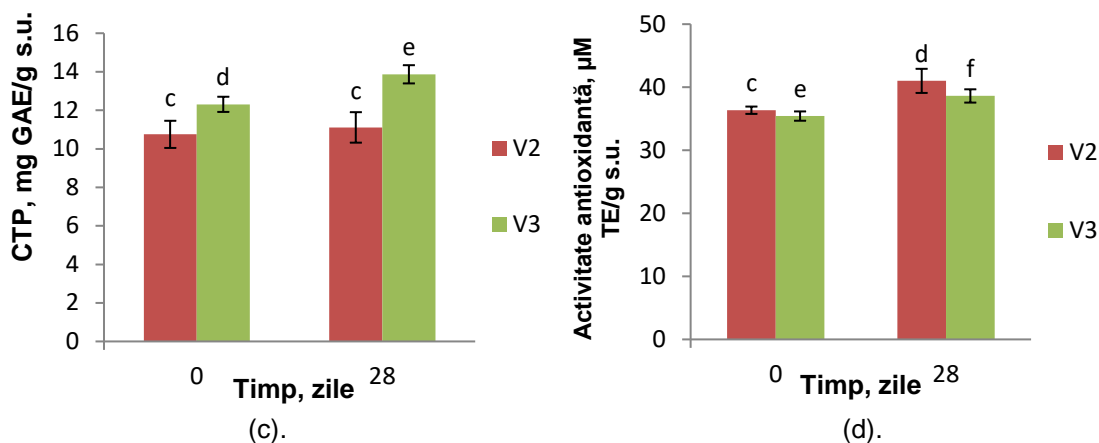
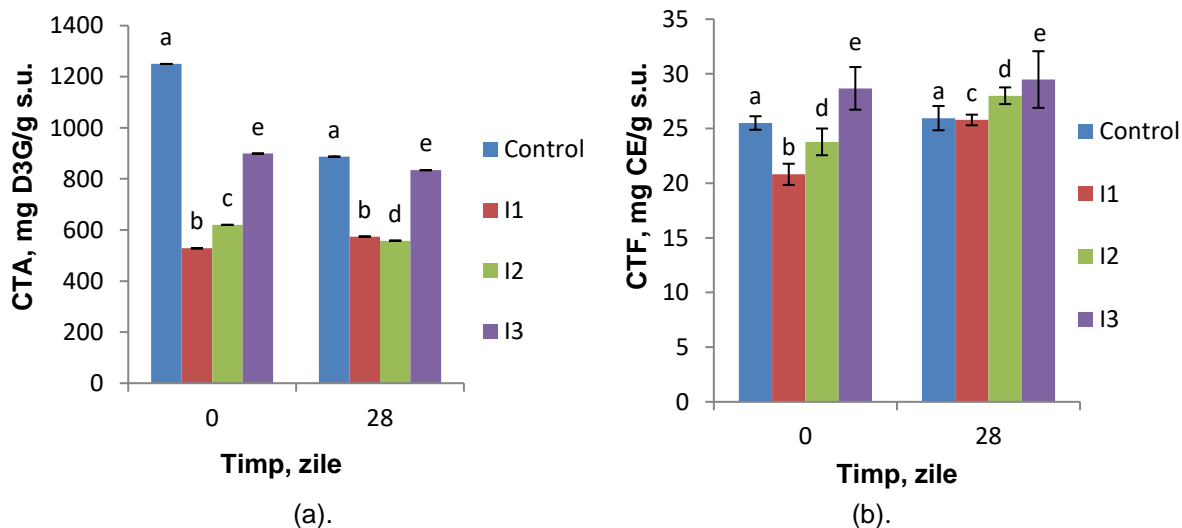


Figura 11.8. Stabilitatea la depozitare a CTA (a), CTF (b), CTP (c) și a activității antioxidante (d) din pulberile produse prin tehnica de liofilizare cu varierea materialelor de încapsulare; V2 – CMC + P; V3 – WPI + Hp(P); Valorile care împărtășesc o literă nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$) conform testului ANOVA;

Stabilitatea la depozitare a compușilor fitochimici din pulberile dezvoltate prin tehnica de liofilizare cu variația raportului dintre materialele de încapsulare

Figura 11.9 ilustrează o scădere semnificativă de aproximativ 31% a CTA în proba martor, în timp ce pentru I1 s-a înregistrat o ușoară creștere de 8%. În I2 s-a înregistrat o ușoară scădere de 11%, în timp ce I3 a prezentat cea mai mare stabilitate, cu o ușoară scădere de 1% a conținutului de CTA. De asemenea, CTP a scăzut între 30,88 ± 0,68 % în I1 și 36,89 ± 1,88% în I3, în timp ce I2 a prezentat o stabilitate bună cu o scădere ușoară de numai 0,12 ± 0, 01% (**figura 11.9**). CTF a crescut în toate probele, în principal în varianta I1, ceea ce a dus și la o creștere a activității antioxidante.



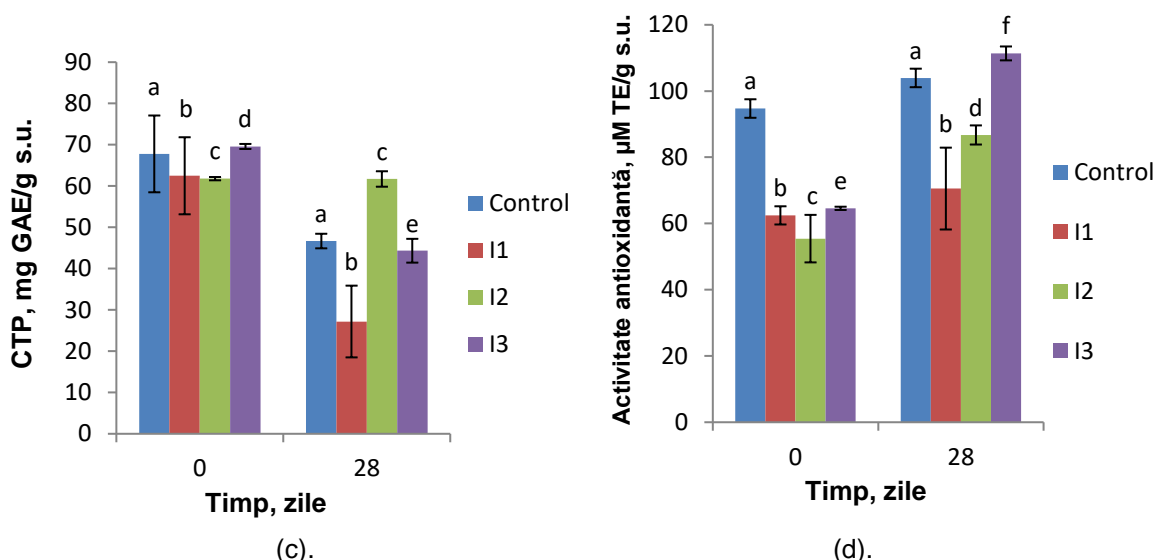
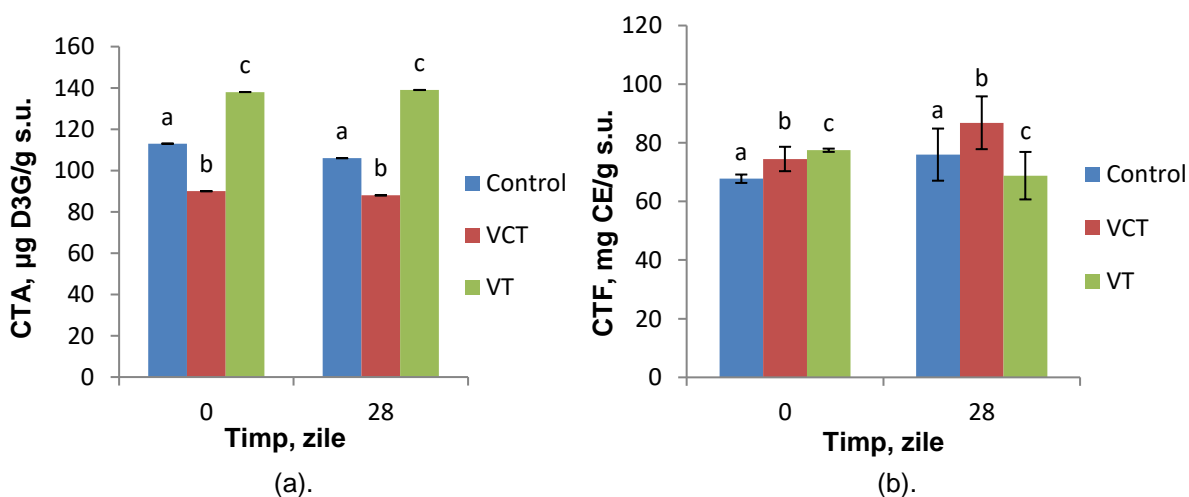


Figura 11.9. Stabilitatea la depozitare a CTA (a), CTF (b), CTP (c) și a activității antioxidante (d) din pulberile concepute prin tehnica de liofilizare cu variația raportului materialului de încapsulare; Control – CMC/P/WPI în 1:1:0.4 ratio, I1 - CMC/P/Hp(T) în 1:1:0.4 ratio; I2 - CMC/P/Hp(T) în 2:1:0.4 ratio; I3 - CMC/P/Hp(T) în 1:2:0.4 ratio; Valorile care împărtășesc o literă nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$) conform testului ANOVA

Stabilitatea la depozitare a compușilor fitochimici din pulberile produse prin tehnica liofilizării cu variația tipului de hidrolizat proteic

În ceea ce privește atât TAC, cât și TFC și TPC se observă o stabilitate remarcabilă a compușilor biologic activi în toate variantele de pudre obținute (**figura 11.10**). Cu toate acestea, o creștere semnificativă a activității antioxidante a apărut în toate variantele experimentale. Se observă o creștere în cazul variantei VCT de 38,60% după 28 de zile de depozitare ($p < 0.05$). Activitatea antioxidantă a probei martor a crescut cu 33,35%, iar cea a VT cu 34,70%.



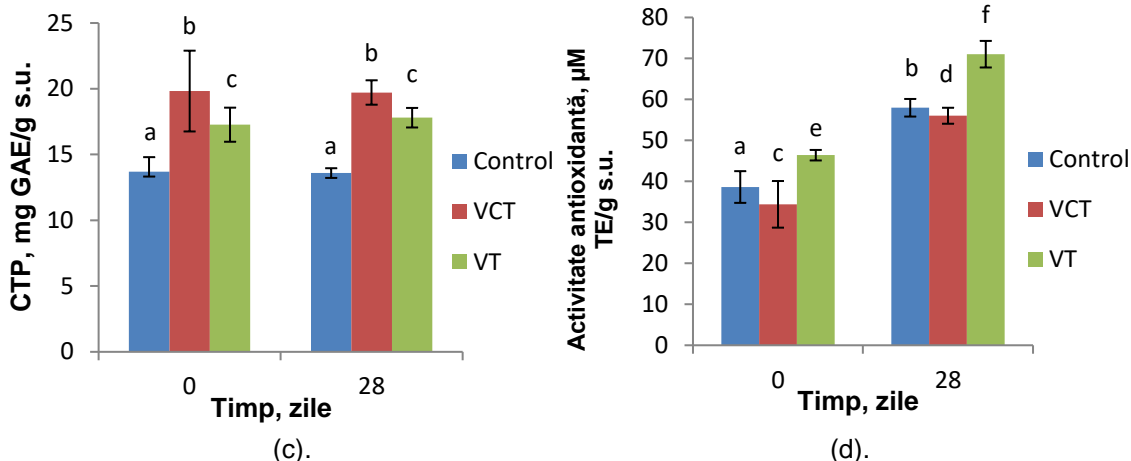
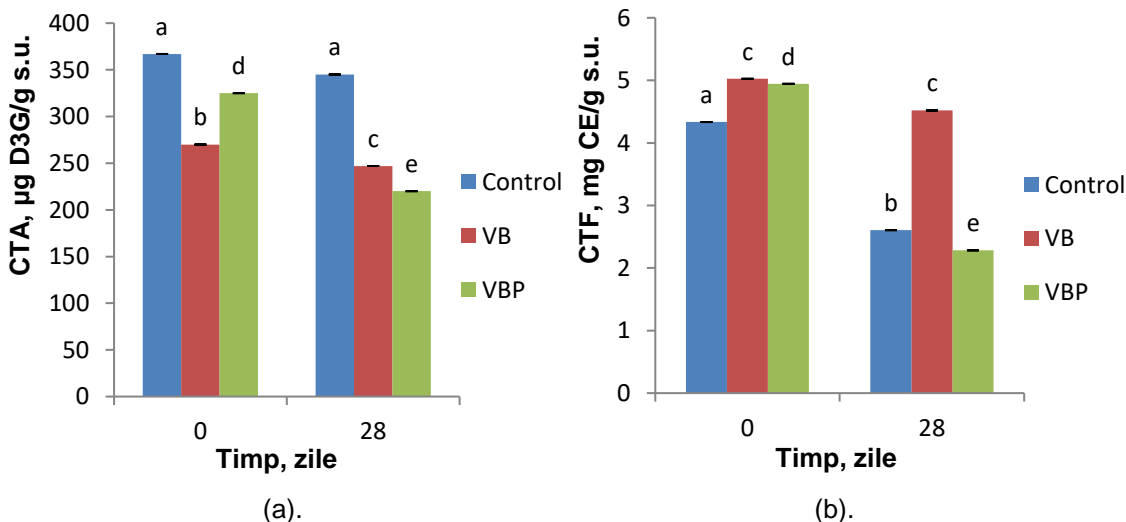


Figura 11.10. Stabilitatea la depozitare a CTA (a), CTF (b), CTP (c) și activitate antioxidantă (d) din pulberile realizate prin tehnica de liofilizare cu variația tipului de hidrolizat proteic; Control – CMC + P + WPI; VCT – CMC + P + Hp(CT); VT – CMC + P + Hp(T); Valorile care împărtășesc o literă nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$) conform testului ANOVA

Stabilitatea la depozitare a compușilor fitochimici din pulberile realizate prin tehnica liofilizării cu variația tulpinilor de bacterii lactice

Depozitarea pulberilor timp de 28 de zile, a determinat o scădere a conținutului de compuși biologic activi, în special în proba codificată VBP, pentru conținutul de antociani monomerici (cu circa 32%), și pentru conținutul de flavonoide totale, în probele codificate martor și VB (cu circa 40% în proba martor și 54% în proba codificată VB). Toate cele trei probe au prezentat o eliberare a compușilor polifenolici, ceea ce a condus la o creștere a activității antioxidante. Toate probele au păstrat o activitate antioxidantă, peste 80 μM Trolox/g s.u. (figura 11.11).



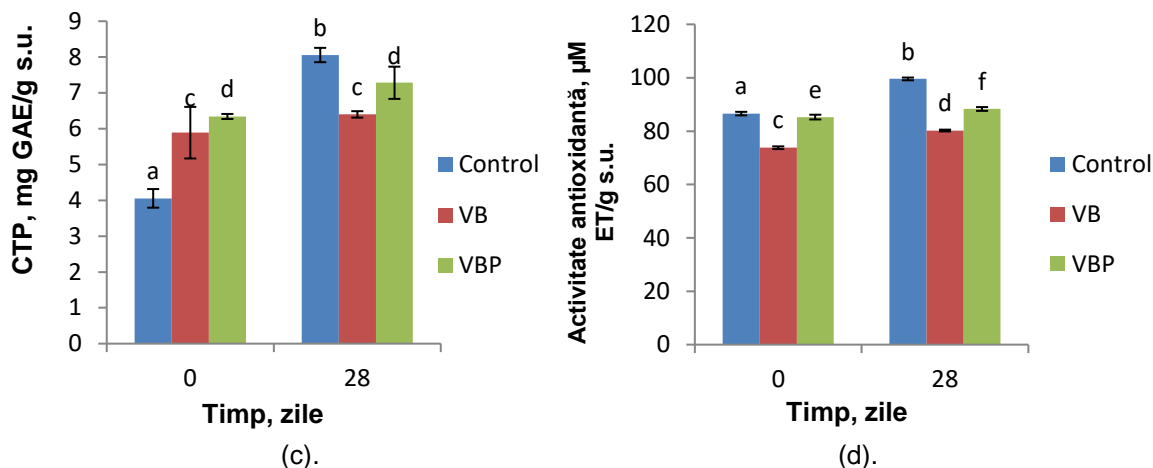


Figura 11.11. Stabilitatea la depozitare a CTA (a), CTF (b), CTP (c) și a activității antioxidante (d) din pulberile preparate prin tehnica de liofilizare cu variația tulpinilor de bacterii lactice; Control – WPI + CMC + P + Hp(β-LgT); VB – WPI + CMC + P + Hp(β-LgT) + *L. bifementans*; VBP - VB – WPI + CMC + P + Hp(β-LgT) + *L. bifementans* + *L. plantarum* (1:1); Valorile care împărtășesc o literă nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$) conform testului ANOVA

În ambele ingrediente, viabilitatea bacteriilor a scăzut cu 1 log, conform **tabelului 11.6**.

Tabelul 11.6. Stabilitatea la depozitare a bacteriilor lactice din pulberi

Varianta de pudră	Viabilitatea celulară (UFC/g s.u.)	
	0 zile	28 zile
Control	-	-
VB	$1,96 \times 10^8$ a	$7,88 \times 10^7$ b
VBP	$1,12 \times 10^9$ a	$1,78 \times 10^8$ b

Valorile care au o literă mică pe linie nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$) conform testului ANOVA; Control – WPI + CMC + P + Hp(β-LgT); VB – WPI + CMC + P + Hp(β-LgT) + *L. bifementans*; VBP - VB – WPI + CMC + P + Hp(β-LgT) + *L. bifementans* + *L. plantarum* (1:1);

Stabilitatea la depozitare a substanțelor fitochimice din pulberile furnizate prin tehnica de gelifiere

Atât CTA (**figura 11.12 a**) cât și CTF (**figura 11.12 b**) ale variantei GV1 nu s-au modificat semnificativ în timpul celor 28 de zile de depozitare ($p > 0,05$). În schimb, pentru GV2, a existat o eliberare de antociani din matrice de aproximativ 20 %. CTP-ul lui GV2 a crescut, de asemenea, cu aproximativ 18 %, în timp ce CTP-ul lui GV1 a rămas constant (**figura 11.12 c**). În ceea ce privește activitatea antioxidantă (**figura 11.12 d**), în GV1 aceasta a scăzut cu 16 % după 28 de zile de depozitare, în timp ce în GV2 a prezentat o creștere de aproximativ 13 %. Deși GV1 a încapsulat o concentrație mai mică de compuși biologic activi decât GV2, are cea mai bună stabilitate la depozitare în timp.

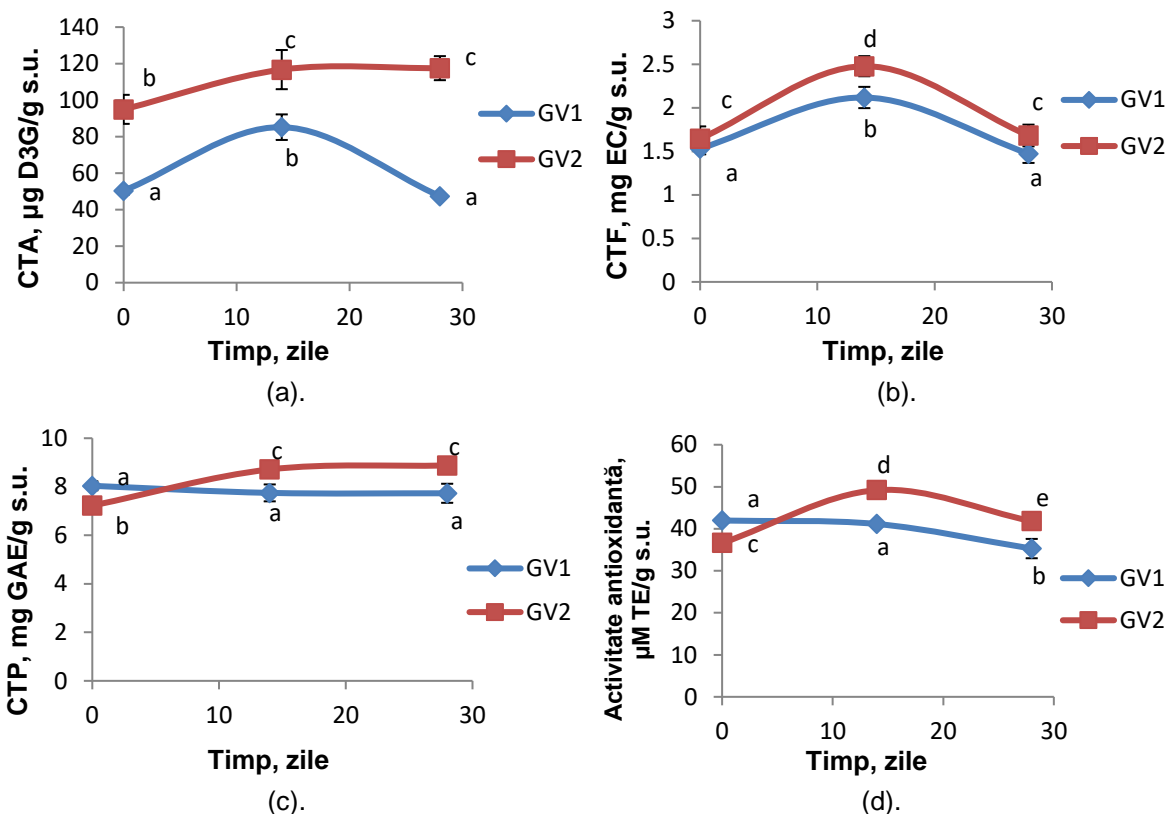


Figura 11.12. Stabilitatea la depozitare a CTA (a), CTF (b), CTP (c) și a activității antioxidante (d) din pulberile produse prin tehnica de gelifiere; GV1 – CMC/PWPI IN A 1:1:2 ratio; GV2 – CMC/PWPI in a 1:1:0.6; Values that share a lowercase letter per column are not significantly different ($p>0.05$) according to the ANOVA test; Valorile care împărtășesc o literă nu sunt semnificativ diferite ($p>0,05$) conform testului ANOVA;

11.4.3. Structura morfologică a pulberilor

Structura morfologică a pulberilor realizate prin tehnica de liofilizare cu variația materialelor de încapsulare

În **figura 11.13** sunt prezentați compușii biologic activi (în special antociani) distribuți uniform în matricea polimerică groasă și, de asemenea, macule de oxalat de calciu, specifice pericarpului cojilor de vinete. **Figura 11.13** prezintă o distribuție uniformă a compușilor biologic activi din coaja de vinete în matricea complexă de microîncapsulare. Particulele de antociani au prezentat dimensiuni medii între 7 și 15 micrometri. Astfel, procesul de încapsulare a fost considerat uniform. Se poate observa că procesul de microîncapsulare în matricea proteică a protejat țesutul vegetal. În același timp, fragmente de țesut vegetal cu un perete celular intact și cu dimensiuni între 60-65 μm au putut fi vizualizate frecvent.

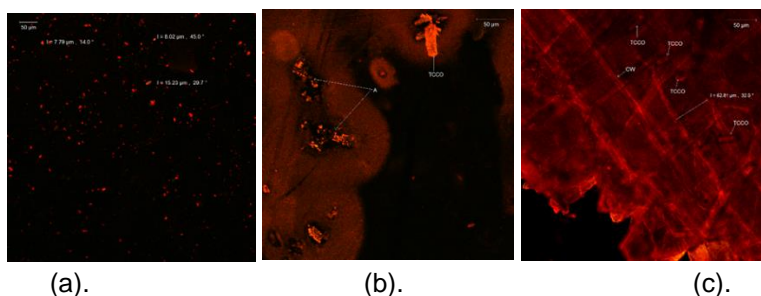


Figura 11.13. Structura morfologică a pulberilor produse prin tehnica liofilizării cu variația materialelor de încapsulare: V1 (a - colorată); V2 (b - colorat) și V3 (c - colorat)

Structura morfologică a pulberilor preparate prin tehnica de liofilizare cu variația raportului dintre materialele de încapsulare

Structura morfologică a celor patru variante este prezentată în imaginile native CLSM din **figura 11.14**. În proba martor s-au observat formațiuni mari, cu contururi neregulate și dimensiuni variabile (între 26,54 și 40,52 μm), cu structuri poroase (cum ar fi microcavități sau fisuri), cu câteva vezicule mici la periferie, cu diametre de 2 - 3 μm (**figura 11.14 a**). În I1 și I2, modelul morfologic al microparticulelor a fost predominant filamentos, probabil datorită prezenței peptidelor. Extensiile în formă de deget sau de ac au variat ca mărime de la 8,54 la 20,20 μm în I2 (**figura 11.14 c**) sau chiar mai mari de 28,53 - 46,16 μm în I1 (**figura 11.14 b**). În I3 (**figura 11.14 d**), probabil datorită unei proporții mai mari de pectină, modelul a fost diferit, cu clustere mari (46,32 - 81,16 μm) formate prin fuziunea sferozomilor.

Imaginile microcapsulelor colorate cu DAPI și roșu Congo au arătat antociani agregati în interiorul matricei. Compușii biologic activi au format particule roșii mici cu diametrul de 1-2 μm (**figura 11.14 e**), fiind distribuite în matrice (colorate în albastru/verde). Nu au putut fi observate diferențe semnificative între control și I1 (**figura 11.14 f**). Cu toate acestea, în I2 (**figura 11.14 g**), au fost observate micro vezicule individuale cu diametre între 6,7 și 14,82 μm . Microsferozomii, cu tendință de aglutinare, erau vizibili în interiorul lor, sugerând o posibilă dublă încapsulare. În I3 (**figura 11.14 h**), s-au observat clustere dense, mari, neregulate, cu dimensiuni cuprinse între 64,43 și 102,10 μm , rezultate posibil din confluența microsferozomilor cu diametre variabile (4-5 μm în medie).

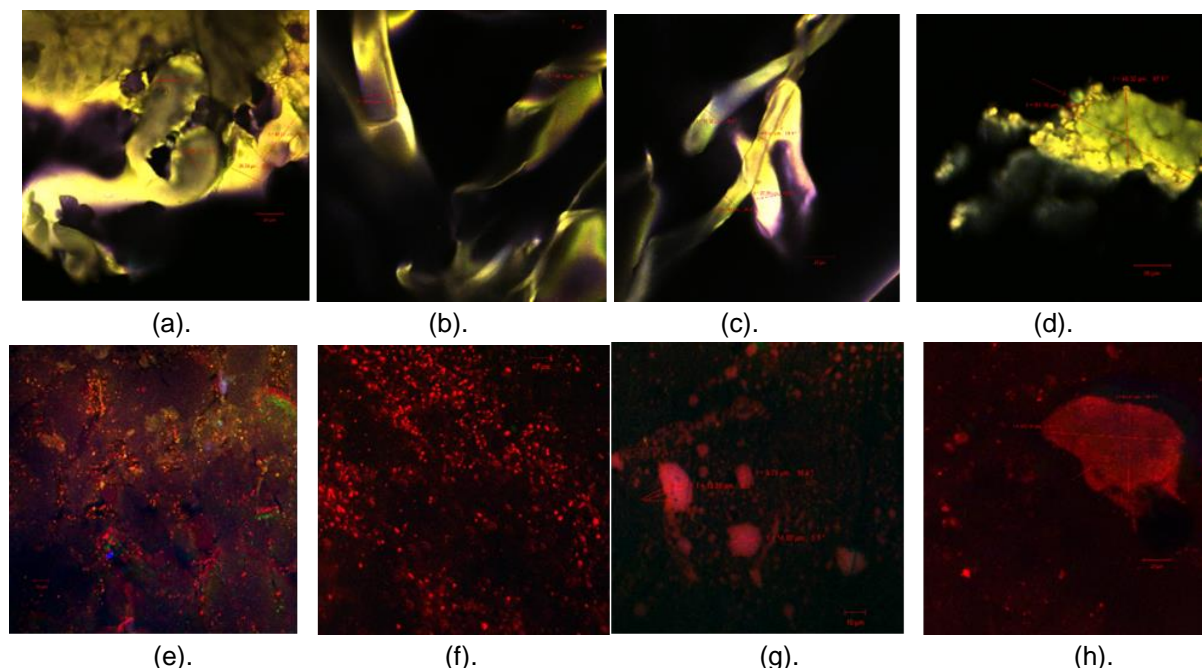


Figura 11.14. Structura morfologică a pulberilor proiectate prin tehnica de liofilizare cu variația raportului materialului de încapsulare: Control (a - nativ, e - colorat); I1 (b - nativ, f - colorat); I2 (c - nativ, g - colorat) și I3 (d - nativ, h - colorat)

Structura morfologică a pulberilor realizate prin tehnica de gelificare

Din **figura 11.15** se observă faptul că, prin încapsulare, compușii biologic activi din exocarpul vinetei au generat un aspect digitiform, dantelat în varianta GV1 (**figura 11.15 a**) și solzi compacti, neregulați în varianta GV2 (**figura 11.15 b**).

Microcapsulele au format biofilme mai mult sau mai puțin omogene prin marcarea cu reactivul colorant roșu Congo (**figura 11.15 c și d**). Compușii bioactivi (în verde) au fost

observați în rețeaua proteică (în roșu) predominantă în matricea probei GV1 (**figura 11.15 c**). Pe măsură ce concentrația de proteine a scăzut și cea de carbohidrați din matrice a crescut, pulberea a devenit mai hidrofilă, mai fină și mai omogenă, iar culoarea fluorescență roșie Congo a fost mai slabă (**Figura 11.15 d**).

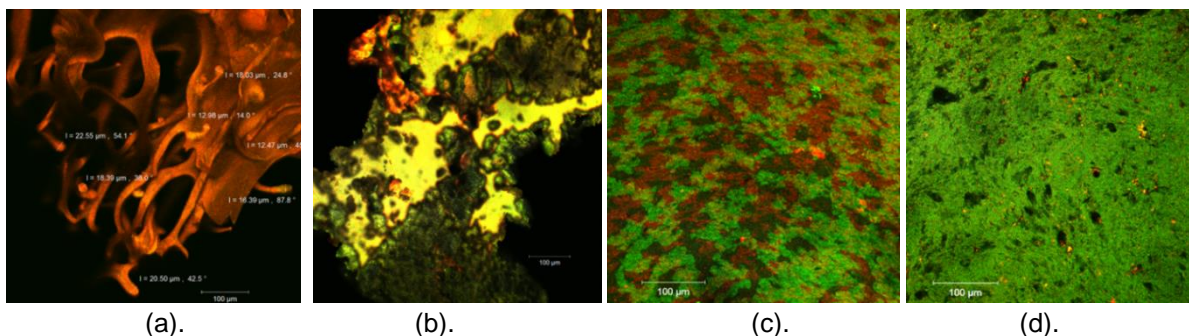


Figura 11.15. Structura morfologică a pulberilor produse prin tehnica de gelificare: GV1 (a - nativ, c - colorat) și GV2 (b - nativ, d - colorat)

11.4.4. Digestibilitatea *in vitro* a antocianilor din pulberi

Digestibilitatea in vitro a antocianilor din pulberile realizate prin tehnica de liofilizare cu variația materialelor de încapsulare

Eliberarea CTA din ingredientele microîncapsulate prin liofilizare a fost studiată prin simularea *in vitro* a digestiei gastrice și intestinale (**figura 11.16**).

În urma simulării digestiei gastrice a ingredientelor (**figura 11.16 a**), s-a observat o creștere a antocianilor de 26,61% în supernatantul probei V2 după 2 ore de digestie. În cazul lui V3, matricea formată doar din proteine și peptide a permis o creștere maximă a antocianilor totali din digestat de 4,55% după 60 min de digestie. În plus, în cazul digestiei gastrice simulate, matricea de proteine și peptide (V3) a avut un efect protector mai mare asupra antocianilor din cojile de vinete decât matricea formată numai de carbohidrați (V2). Cu toate acestea, acest lucru s-a schimbat în timpul digestiei intestinale simulate (**figura 11.16 b**). În acest caz, V3 a dus la eliberarea completă a antocianilor din matrice după 2 ore de digestie, în timp ce pentru antocianii din V2 eliberarea a avut loc mai lent, fiind de numai 94,41% după cele 2 ore de digestie simulată.

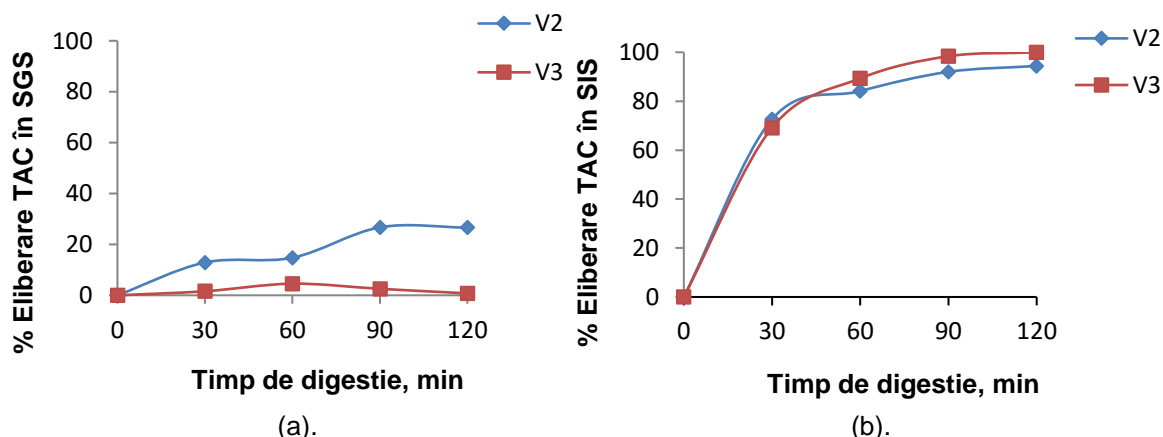


Figura 11.16. Digestibilitatea *in vitro* gastrică (a) și intestinală (b) a pulberilor produse prin tehnica de liofilizare cu variația materialelor de încapsulare

Digestibilitatea *in vitro* a antocianilor din pulberile preparate prin tehnica de liofilizare cu variația raportului dintre materialele de încapsulare

Digestibilitatea *in vitro* în SGS a demonstrat că matricele de încapsulare selectate au exercitat un efect protector asupra antocianilor în toate variantele experimentale (**figura 11.17**). O creștere maximă de până la $12,43 \pm 0,15\%$ după 120 min de digestie a fost observată în cazul I1 pentru CTA. Dintre probele investigate, în cazul martor și I3, s-a remarcat cel mai mare efect protector, cu o scădere ușoară de maxim $3,76 \pm 0,09\%$ și, respectiv, $4,28 \pm 0,01\%$, după 120 min de digestie (**figura 11.17 a**). În SIS, rezultatele au arătat că s-a eliberat concentrația maximă de antociani după 120 min de digestie în toate ingredientele, cu o valoare maximă înregistrată pentru I3 de $41,47 \pm 1,40\%$, urmată de I2 cu $25,86 \pm 1,85\%$ și I1 de $22,40 \pm 1,13\%$, respectiv (**figura 11.17 b**).

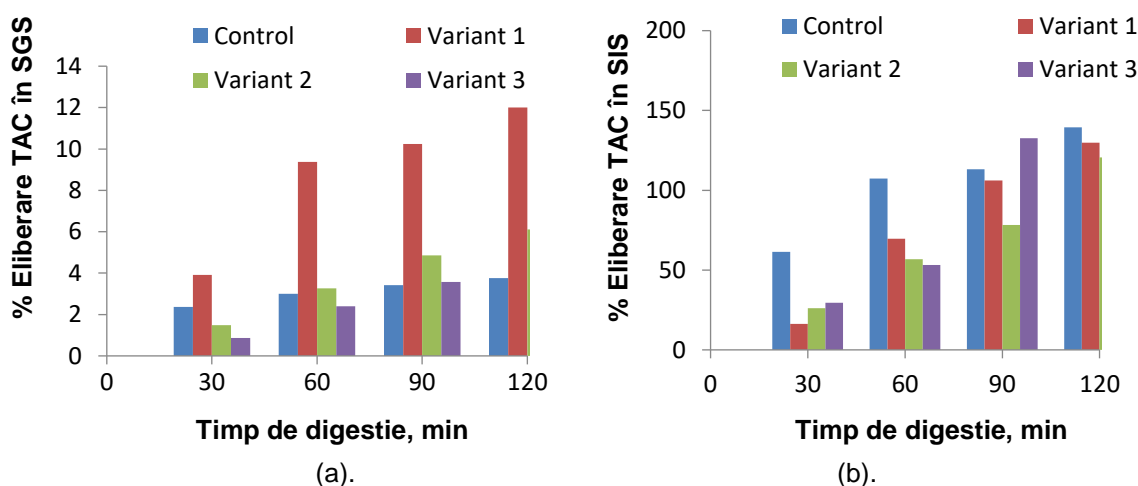


Figura 11.17. *In vitro* digestibilitatea gastrică (a) și intestinală (b) a pulberilor produse prin tehnica de liofilizare cu variația raportului materialului de încapsulare: control; varianta 1 (I1); varianta 2 (I2); varianta 3 (I3);

11.4.5. Biocompatibilitatea *in vitro* a pulberilor

Testarea biocompatibilității *in vitro* a pulberilor concepute prin tehnica de liofilizare cu variația raportului dintre materialele de încapsulare

Citotoxicitatea microcapsulelor dezvoltate prin microîncapsularea extractului din coji de vinete a fost evaluată prin teste *in vitro* pe o cultură de celule fibroblaste din linia stabilizată NCTC clona L929 prin metoda Neutral Red. Rezultatele găsite după 24 de ore de cultivare sunt expuse în **tabelul 11.6**.

Tabel 11.6. Viabilitatea celulelor fibroblaste cultivate în prezența microparticulelor timp de 24 de ore, determinată prin metoda Roșu Neutru (procent de cultură martor, %)

Concentrație (μg/mL)	10	50	100	250	500	750	1000
Control	118,34	108,92	113,89	117,56	116,41	85,28	82,73
I1	110,47	102,83	102,83	104,05	101,65	100,47	98,66
I2	116,80	115,35	105,39	113,64	106,20	100,47	94,95
I3	112,89	111,49	117,08	109,58	79,25	49,96	21,71

După 24 de ore de cultivare a celulelor fibroblaste în prezența probelor, viabilitatea celulară a fost ridicată, cu valori cuprinse între 79,25% și 118,34%, cu excepția I3. Astfel, toate probele au fost necitotoxice pentru cultura de celule L929 (valori ale viabilității celulare >80%),

În intervalul de concentrații testate, între 10-1000 $\mu\text{g/mL}$, cu excepția I3. Aceste rezultate demonstrează că probele cu compuși polifenolici testate au acționat ca stimuli ai metabolismului celular.

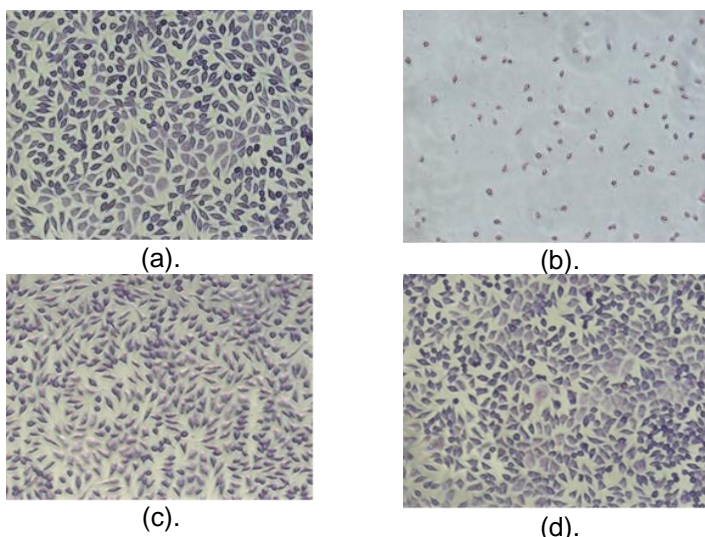
Rezultatele după 48 de ore de cultivare sunt afișate în **tabelul 11.7**.

Tabel 11.7. Viabilitatea celulelor fibroblaste cultivate în prezența microparticulelor timp de 48 de ore, folosind metoda Roșu Neutru (procent de cultură martor, %)

Concentrație ($\mu\text{g/mL}$)	10	50	100	250	500	750	1000
Control	103,65	100,18	103,36	100,13	99,95	98,47	99,32
I1	117,36	114,50	111,63	111,79	108,38	116,07	114,93
I2	106,89	114,66	118,71	115,29	108,21	107,51	91,44
I3	100,37	101,19	101,53	102,75	88,24	28,42	8,09

După 48 de ore de cultură, toate probele au fost necitotoxice pentru cultura de celule fibroblaste L929 (valori ale viabilității celulare $> 80\%$), în intervalul de concentrații testate, între 10-1000 $\mu\text{g/mL}$, cu excepția I3 pentru care s-a observat, la concentrații mai mari de 500 $\mu\text{g/mL}$, o scădere bruscă a viabilității celulare până la 8,09 %. Rezultatele demonstrează că I3 a fost biocompatibil numai în intervalul 10-500 $\mu\text{g/mL}$ și a prezentat citotoxicitate la concentrații mai mari. Proba I1 a stimulat proliferarea celulară după 48 de ore de cultură pe întregul interval de concentrații testate. Proba martor a fost biocompatibilă în intervalul 10-1000 $\mu\text{g/mL}$. Varianta I2 a stimulat proliferarea celulară în intervalul 10-750 $\mu\text{g/mL}$ și la 48 de ore de cultură.

Morfologia celulară a fost analizată după 48 de ore de cultură în prezența diferitelor concentrații de particule (**figura 11.18**). Imaginile de microscopie optică au ilustrat faptul că celulele tratate cu antociani au menținut fenotipul fusiform normal, caracteristic celulelor fibroblaste, similar cu proba de control a culturii netratate. Celulele au fost distribuite uniform pe placa de cultură, iar densitatea celulelor a fost similară sau chiar mai mare în comparație cu proba de control netratată. În schimb, culturile de fibroblaste tratate cu 0,003 % H_2O_2 și I3 cu o concentrație de 1000 $\mu\text{g/mL}$ au prezentat o morfologie alterată, cu numeroase celule degenerate și lizate, cu o densitate celulară scăzută, ceea ce a indicat un efect citotoxic al probei. Aceste observații au confirmat datele cantitative obținute prin metoda Roșului Neutru.



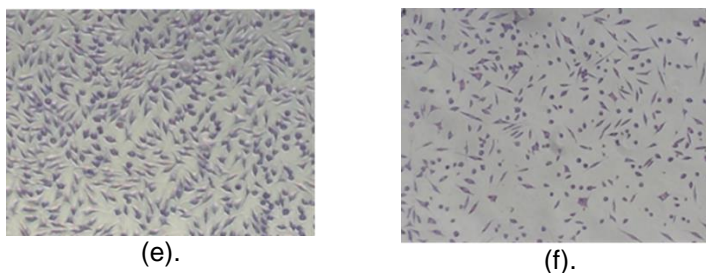


Figura 11.18. Imagini de microscopie optică ale celulelor fibroblastice cultivate în prezență de pulberi timp de 48 de ore, în condiții standard (37 °C, atmosferă cu 5% CO₂) prin colorare Giemsa: Blank (a); H₂O₂ (b); Martor - 1000 µg/mL (c); I1 – 1000 µg/mL (d), I2 - 1000 µg/mL (e), I3 - 1000 µg/mL (f)

Testarea biocompatibilității *in vitro* a pulberilor produse prin tehnica de liofilizare cu variația tulpinilor de bacterii lactice

Rezultatele evaluării biocompatibilității *in vitro* (tabelele 11.8 și 11.9) au demonstrat că toate variantele au fost biocompatibile deoarece, în comparație cu proba martor (celele în mediu de cultură), celulele cultivate în prezența ingredientelor funcționalizate au prezentat valori ridicate de viabilitate și proliferare și morfologia lor în cultură a fost normală, caracteristică fenotipului celulelor fibroblaste.

Tabel 11.8. Viabilitatea celulelor fibroblaste cultivate în prezența ingredientelor funcționalizate timp de 24 de ore, determinată prin metoda Roșu Neutru (procent de cultură martor, %)

Concentrație (µg/mL)	10	50	100	250
Control	92,37	94,87	96,30	90,58
VB	96,43	101,50	103,18	102,43
VBP	107,16	108,78	109,16	111,69

Tabel 11.9. Viabilitatea celulelor fibroblaste cultivate în prezența microparticulelor timp de 48 de ore, determinată prin metoda Roșu Neutru (procent de cultură martor, %)

Concentrație (µg/mL)	10	50	100	250
Control	110,25	108,85	107,06	103,66
VB	104,79	103,08	101,02	94,03
VBP	92,17	94,06	92,78	93,41

Din **tabelele 11.8 și 11.9**, se poate sublinia faptul că proba martor a fost compatibilă în intervalul de concentrații de 10-250 µg/mL, atât după 24 de ore, cât și 48 de ore de cultivare. Valorile viabilității celulare au fost semnificativ mai mari decât martorul netratat, ajungând la 110 % după 48 de ore de cultură. VB a fost biocompatibil pe tot intervalul de concentrații testat după 24 de ore și 48 de ore de cultivare. Valorile viabilității celulare au fost nesemnificativ mai mari decât martorul netratat, fiind de 103 % după 24 de ore de cultură și de 104 % după 48 de ore de cultură. VBP a fost biocompatibil în intervalul de concentrații 10-250 µg/mL, stimulând proliferarea celulară la concentrații de 50-250 µg/mL, atât după 24 de ore de cultură, cât și după 48 de ore de cultură. La aceste concentrații, valorile viabilității celulare au fost semnificativ mai mari decât martorul netratat, crescând până la 112 % după 24 de ore de cultură, dar au scăzut sub 100 % după 48 de ore de cultură.

Morfologia celulară a fost analizată după 48 de ore de cultivare în prezența extractelor microîncapsulate (**figura 11.19**). Imaginile au arătat că celulele tratate cu extracte din coji de vinete microîncapsulate în concentrații de 10-250 µg/mL și-au menținut fenotipul fusiform normal, caracteristic celulelor fibroblaste, similar culturii netratate.

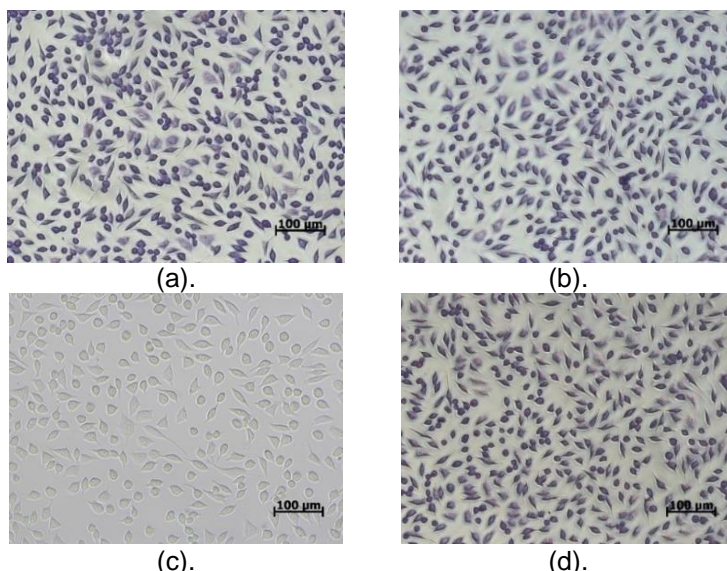


Figura 11.19. Imagini de microscopie optică ale celulelor fibroblastice cultivate în prezență de pulberi timp de 48 de ore, în condiții standard (37 °C, atmosferă cu 5% CO₂) prin colorare Giemsa: Blank (a); Martor - 250 µg/mL (b); VB – 250 µg/mL (c), VBP - 250 µg/mL (d)

11.5. Concluzii parțiale

Rezultatele acestui studiu susțin multifuncționalitatea ingredientelor concepute prin încapsularea extractului etanolic din cojile de vinete. Au fost testate două metode de încapsulare: tehnica de liofilizare și cea de gelifiere combinată cu liofilizarea. A fost utilizate diferite combinații de matrici de încapsulare care exploatează potențialul biologic, funcțional și tehnologic al proteinelor din zer, peptidelor, CMC și P. Astfel, în cazul încapsulării prin liofilizare au fost realizate mai multe microcapsule experimentale în care au fost variate materialele de încapsulare și concentrațiile acestora. De asemenea, au fost concepute variante în care s-au adăugat diferite tipuri de hidrolizate de proteine și tulpini de bacterii lactice.

Rezultatele au permis elaborarea următoarelor concluzii parțiale:

- ✓ Metodele și materialele de încapsulare au încapsulat cu succes compușii biologic activi din cojile vinetelor.
- ✓ Microparticulele au avut eficiențe mari de încapsulare și concentrații ridicate de compuși biologic activi, având și activitate antioxidantă ridicată.
- ✓ Cu toate acestea, cele mai bune rezultate au fost observate pentru ingredientele dezvoltate prin liofilizare.
- ✓ Totuși, cele mai bune rezultate din analiza concentrațiilor de compuși fitochimici și a stabilității acestora au fost pentru ingredientele concepute prin liofilizare.
- ✓ Drept urmare, acele pudre au fost testate ulterior în ceea ce privește modul de comportare în condiții simulate ale tractului gastrointestinal. S-a observat o eliberare de antociani din pulberi în tractul gastrointestinal.
- ✓ Microparticulele testate au fost citocompatibile, stimulând proliferarea culturii de celule fibroblaste.

CAPITOLUL 12. DEZVOLTAREA DE TEHNOLOGII PENTRU ALIMENTE CU VALOARE ADĂUGATĂ

12.2. Obiectivul studiului

Acest studiu a avut drept scop proiectarea de produse alimentare cu valoare adăugată prin îmbogățirea cu ingrediente funcționale obținute prin microîncapsularea extractului din coji de vinete.

Obiectivele acestui studiu au fost:

- Realizarea de bezele cu valoare adăugată, înghețată cu valoare adăugată, sosuri pentru desert cu valoare adăugată;
- Caracterizarea produselor alimentare cu valoare adăugată din punct de vedere al concentrațiilor de compuși fitochimici, al activității antioxidante, stabilității și texturii acestora;

12.4. Rezultate și discuții

12.4.1. Caracterizarea și stabilitatea fitochimică la depozitarea în timp a bezelor cu valoare adăugată

Probele au fost analizate în ceea ce privește CTA și activitatea antioxidantă inițială și după păstrarea timp de 7 zile la temperatura camerei (**tabel 12.1**).

Tabel 12.1. Variația CTA ($\mu\text{g D3G/g dw}$) și a activității antioxidante ($\mu\text{M TE/g dw}$) în variantele de beza, pe parcursul a 7 zile de depozitare la 25°C

Caracteristici	Timp depozitare, zile	Bezele		
		B1	B2	B3
CTA ($\mu\text{g D3G/g s.u.}$)	0	28,33 \pm 10,26	36,49 \pm 1,46	92,11 \pm 2,28
	7	13,45 \pm 5,17	19,76 \pm 1,67	11,18 \pm 0,12
Activitate antioxidantă, ($\mu\text{M TE/g s.u.}$)	0	7,02 \pm 0,19	8,41 \pm 0,27	8,84 \pm 0,14
	7	1,35 \pm 0,24	2,04 \pm 0,67	1,03 \pm 0,24

Din **tabelul 12.1** se poate observa faptul că produsele care conțin hidrolizate (B2 și B3) au avut o concentrație de antociani mai mare decât B1 (fără hidrolizat). Același comportament poate fi observat și pentru activitățile antioxidante. Indiferent de varianta experimentală, bezele cu adaos de microcapsule au prezentat o CTA ridicată și activitate antioxidantă. Însă, acestea au prezentat o stabilitate scăzută a compușilor fitochimici, CTA scăzând cu 46 % în B2 și 88 % în B3, în timp ce activitatea antioxidantă a scăzut cu 76 % pentru B2 și 88 % pentru B3 după 7 zile de păstrare la temperatura camerei (**tabel 12.1**).

12.4.2. Caracterizarea și stabilitatea fitochimică la depozitarea în timp a înghețatei cu valoare adăugată

Rezultatele inițiale și după 21 de zile de depozitare sunt detaliate în **tabelul 12.2**. Probele cu microparticule adăugate au prezentat valori similare pentru CTA și CTP, în timp ce IVBP a prezentat activitate antioxidantă cu 22 % mai mare decât IVB (**tabelul 12.2**). Ambele înghețate funcționalizate cu LAB au prezentat o concentrație de bacterii de ordinul 7 log/g produs. În matricea selectată, depozitarea înghețatei a condus la o eliberare semnificativă de compuși biologic activi din co-microcapsule, conducând la valori duble ale activității antioxidante pentru variantele îmbogățite. Bacteriile lactice și-au menținut viabilitatea la depozitare.

Tabel 12.2. Caracteristicile fitochimice și funcționale ale înghețatei cu valoare adăugată

Caracteristici fitochimice	Timp depozitare, zile	IM	IVB	IVBP
CTA (mg D3G/g s.u.)	0	-	2,26 ± 0,14 ^{bB}	3,92 ± 0,33 ^{aB}
	28	-	6,97 ± 0,39 ^{bA}	8,97 ± 0,16 ^{aA}
CTP (mg GAE/g s.u.)	0	-	85,16 ± 4,02 ^{bD}	99,65 ± 7,06 ^{aD}
	28	-	139,76 ± 5,42 ^{bC}	207,12 ± 8,18 ^{aC}
Activitate antioxidantă (μM TE/g s.u.)	0	142,97 ± 6,85 ^{cF}	389,49 ± 29,51 ^{bF}	496,90 ± 44,52 ^{aF}
	28	449,81 ± 4,72 ^{bE}	831,82 ± 79,01 ^{aE}	924,67 ± 42,94 ^{aE}
Viabilitate LAB (UFC/g s.u.)	0	-	5,55 x 10 ⁷ ^{aG}	5,05 x 10 ⁷ ^{aG}
	28	-	4,80 x 10 ⁷ ^H	1,60 x 10 ⁷ ^H

12.4.3. Caracterizarea și stabilitatea fitochimică la depozitarea în timp a sosurilor pentru desert cu valoare adăugată

Sosurile cu valoare adăugată a fost analizat din punct de vedere fizico-chimic, rezultatele fiind prezentate în **tabelul 12.3**.

Tabel 12.3. Caracteristicile fizico-chimice ale sosurilor cu valoare adăugată (M- fără pudră adăugată, T1 și T2 - cu pulbere adăugată de 0,5 și 1 % (g/g))

Proba	Proteine (g/100 g)	Lipide (g/100 g)	Glucide (g/100 g)	Umiditate (g/100 g)	Fibre (g/100 g)	Valoare energetică (kcal)
M	4,24 ± 0,15	7,90 ± 0,61	66,05 ± 2,21	21,80 ± 0,20	8,10 ± 0,05	361,65 ± 8,57
T1	4,24 ± 0,14	7,91 ± 0,99	66,74 ± 3,41	21,11 ± 0,25	9,38 ± 0,17	364,57 ± 7,99
T2	4,24 ± 0,21	7,91 ± 0,79	67,22 ± 2,75	20,63 ± 0,20	9,86 ± 0,36	366,54 ± 8,12

Tabel 12.3 arată că adăugarea ingredientului conceput prin microîncapsularea compușilor bioactivi din extractul de coji de vinete în sosul pentru desert a avut o contribuție importantă la conținutul de fibre. Acesta a crescut cu 14 %, respectiv 18 % comparativ cu proba martor. A existat, de asemenea, o ușoară creștere a conținutului de carbohidrați în ambele sosuri cu ingrediente adăugate.

Sosurile au fost păstrate în borcane de sticlă cu capace închise ermetic la 4 °C timp de 28 de zile. Rezultatele caracterizării fitochimice a celor trei variante de sos, înainte și după depozitarea în timp, sunt prezentate în **tabelul 12.4**. Rezultatele au fost incluse în cererea de brevet A00532/08.10.2021.

Tabel 12.4. Conținutul fitochimic al sosurilor pentru desert îmbogățite cu microcapsule înainte și după depozitare la 4 °C timp de 28 de zile

Proba	Timp, zile	CTA (μg D3G/g s.u.)	CTF (mg CE/g s.u.)	CTP (mg GAE/g s.u.)	Activitate antioxidantă (μM TE/g s.u.)
M	0	nd	nd	nd	32,63 ± 1,02 ^{aA}
	28	nd	nd	nd	26,54 ± 7,60 ^B
T1	0	147,17 ± 19,83 ^a	21,84 ± 1,12 ^{aA}	90,12 ± 3,60 ^{aA}	94,78 ± 2,74 ^{bC}
	28	nd	8,59 ± 0,40 ^B	51,61 ± 2,46 ^B	99,83 ± 3,42 ^C
T2	0	78,56 ± 6,18 ^{bA}	11,70 ± 1,39 ^{bC}	62,42 ± 3,97 ^{bC}	161,84 ± 4,19 ^{cE}
	28	128,74 ± 14,01 ^B	17,40 ± 2,64 ^C	37,15 ± 1,58 ^D	181,29 ± 6,15 ^F

Valorile care au o singură literă pe coloană nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$) conform testului ANOVA. Literele mici evidențiază diferențele dintre probe în ceea ce privește conținutul fitochimic înainte de depozitare. Literele mari arată modificări ale conținutului fitochimic după păstrarea la 4 °C timp de 28 de zile

Conform rezultatelor din **tabelul 12.4**, se observă diferențe semnificative între cele trei sosuri în ceea ce privește concentrațiile de compuși fitochimici, așa cum era de așteptat. Astfel, s-au observat concentrații semnificativ mai mari de antociani, flavonoide și polifenoli în varianta cu 0,5 % microcapsule (T1) comparativ cu sosul cu 1 % ($p < 0,05$). În plus, așa cum era de așteptat, compușii fitochimici analizați nu au fost detectați în sosul fără pudră. În schimb, în ceea ce privește activitatea antioxidantă, sosul martor a avut cea mai scăzută valoare și nu au existat diferențe semnificative statistic între cele două variante de sos cu pudră adăugată ($p > 0,05$). Deși T2 a avut cel mai mare adaos de particule, a prezentat cele mai scăzute valori ale substanțelor fitochimice. Acest lucru se poate explica prin faptul că probabil în T1, fiind mai puțin ingredient, s-a solubilizat mai repede decât în T2.

După păstrarea sosurilor la 4 °C, s-au observat modificări semnificative ale concentrației de compuși fitochimici după 28 de zile ($p < 0,05$). În ceea ce privește T1, după 28 de zile de păstrare, concentrația de antociani a scăzut până când nu a mai putut fi detectată spectrofotometric. **Tabelul 12.4** detaliază, de asemenea, o scădere semnificativă a CTF și CTP în T1 ($p < 0,05$), în timp ce activitatea antioxidantă a rămas constantă. Pe de altă parte, concentrația de antociani în T2 a crescut semnificativ în cele 28 de zile ($p < 0,05$), probabil datorită solubilizării complete a pulberii în timp. Deși în cazul acestui sos, CTF a rămas constantă pe parcursul celor 28 de zile de păstrare, CTP a scăzut semnificativ ($p < 0,05$). Creșterea CTA poate fi corelată cu activitatea antioxidantă, aceasta din urmă prezentând o creștere semnificativă după 28 de zile de păstrare ($p < 0,05$).

12.4.4. Caracterizarea texturii sosurilor pentru desert cu valoare adăugată

Tabelul 12.5 enumeră valorile analizei parametrilor texturali ai sosului pentru desert îmbogățit cu ingrediente funcționale din coji de vinete.

Tabel 12.5. Parametrii texturali ai probelor de sos cu adăugarea de pulbere de coajă de vinete

Parametri texturali	M	T1 (0.5 %)	T2 (1 %)
Fermitate (N)	1,59	1,97	2,58
Adeziune (mJ)	10,41	16,38	16,66
Coezivitate	0,65	0,57	0,53
Elasticitate (mm)	14,49	13,16	13,27

Din **Tabelul 12.5**, se poate observa că adaosul de pulberi din extract de coji de vinete a îmbunătățit fermitatea cu aproximativ 24 % în T1 și cu 62 % în T2. Creșterea fermității poate fi asociată cu creșterea rezistenței la deformare, ceea ce indică o bună stabilitate. Cea mai mică valoare de aderență de 10,41 mJ a fost înregistrată pentru martor (M), ceea ce indică faptul că adăugarea de pulber a crescut aderența sosului. Coeziunea a înregistrat valori invers proporționale cu concentrația de pudră adăugată, ceea ce a indicat o capacitate îmbunătățită de dezintegrare în timpul mestecării. Elasticitatea a înregistrat cea mai mare valoare pentru M.

12.5. Concluzii parțiale

Ingredientele obținute anterior au fost testate din punct de vedere al funcționalității în diferite matrici alimentare, iar cele alese au fost bezele, înghețată și sosul pentru desert.

Rezultatele au permis elaborarea următoarelor concluzii parțiale:

- ✓ Față de variantele martor, produsele cu valoare adăugată au prezentat funcționalitate printr-un conținut ridicat de compuși biologic activi și activitate antioxidantă.

- ✓ Ingredientele multifuncționale au prezentat o bună stabilitate în sistemele alimentare testate, utilizarea lor nefiind limitată de matrice, cu excepția bezelor unde s-a observat o scădere a concentrației totale de antociani și a activității antioxidante.
- ✓ Viabilitatea bacteriilor lactice s-a menținut la peste 10^7 pentru ambele variante de înghețată.
- ✓ Adăugarea ingredientului realizat prin microîncapsularea extractului din coaja de vinete folosind carboximetil celuloză și pectină în sosul pentru desert a crescut cu 14-18 % conținutul de fibre al sosului pentru deserturi comparativ cu proba martor.
- ✓ Analiza texturii toppingurilor a relevat faptul că adaosul de pulbere concepută prin microîncapsularea extractului din coji de vinete a îmbunătățit caracteristicile texturale ale sosului.

CAPITOLUL 13. CONCLUZII GENERALE

În prezent, o dietă echilibrată reprezintă obiectivul principal de prevenire a deficiențelor și a bolilor legate de alimentație. Provocarea majoră a științei este îmbunătățirea calității vieții. În acest context, abordările prezentate în teza de doctorat intitulată **“Proiectarea de ingrediente noi bazate pe compuși bioactivi din vinete pentru diferite aplicații în industria alimentară”** au vizat identificarea, cuantificarea și valorificarea compușilor biologic activi din cojile de vinete alături de peptidele din zer. Dezvoltarea de ingrediente funcționale pentru utilizare în alimente cu beneficii pentru sănătate, folosind compușii activi biologic din cojile de vinete și peptidele din zer, reprezintă scopul final al acestui studiu.

Prin urmare, obiectivele principale ale tezei de doctorat au fost:

- ✚ Cuantificarea și identificarea compușilor biologic activi din cojile de vinete extrași prin diverse metode în care parametrii au fost variați pentru a stabili condițiile optime.
- ✚ Microîncapsularea compușilor biologic activi din cojile de vinete pentru a produce ingrediente cu funcționalitate ridicată prin creșterea stabilității și eliberarea controlată a acestora.
- ✚ Dezvoltarea de tehnologii alimentare prin adaosul de ingrediente funcționale microîncapsulate.

Toate cele trei obiective au fost atinse, ceea ce a permis formularea următoarelor concluzii generale:

- ✚ Au fost comparate patru metode de extracție în ceea ce privește conținutul de compuși biologic activi, cu accent pe antociani, în care concentrația solventului, acidul, timpul de extracție și temperatura au fost variate.
- ✚ Profilul cromatografic al extractelor din coji de vinete a indicat prezența a cinci antociani, derivați ai delfinidinei, cianidinei și petunidinei. Cu toate acestea, compusul majoritar din extractele selectate a fost delfinidin 3-O-glucozid.
- ✚ Testarea stabilității procesării termice și digestibilitatea simulată *in vitro* au arătat o instabilitate crescută a antocianilor din extracte la condițiile de mediu.
- ✚ Procesul de hidroliză enzimatică a proteinelor din zer a condus la obținerea de peptide cu grade diferite de hidroliză, activitate antioxidantă și efect prebiotic.
- ✚ Tehnicile de spectroscopie cu fluorescență au fost utilizate pentru caracterizarea mecanismelor de legare dintre proteinele din zer și antociani din extractul din coji de vinete, ca etapă preliminară a microîncapsulării, pentru a putea prezice condițiile optime și particularitățile de legare din perspectiva preparării compozitelor cu funcționalitate.
- ✚ Această instabilitate a condus la tehnici de creștere a stabilității compușilor din extractul de coji de vinete care se bazează pe procesul de microîncapsulare. Astfel, liofilizarea și gelifierea au condus la particule fine cu activitate biologică ridicată, în special activitate antioxidantă.
- ✚ Ingredientele au fost îmbogățite cu peptide și, în unele cazuri, cu bacterii lactice.
- ✚ Microparticulele au avut structuri morfologice și dimensiuni variate datorită diferitelor metode și materiale de încapsulare. S-a observat de asemenea o stabilitate crescută a antocianilor în sistemul gastrointestinal simulat cu eliberare controlată în intestin, pulberile stimulând de asemenea proliferarea celulară în intervalul de concentrație testat.
- ✚ Funcționalitatea a fost testată prin adaosul ingredientelor în bezele, înghețată și sos pentru deserturi. S-a demonstrat că pulberile au oferit valoare produselor în care au fost adăugate prin creșterea concentrațiilor de compuși biologic activi și a activității antioxidante, în unele cazuri influențând pozitiv textura.

- ✚ Prin urmare, studiul a demonstrat potențiala dezvoltare a ingredientelor multifuncționale bazate pe compuși biologic activi din cojile de vinete, peptide din zer și bacterii lactice pentru aplicații în industria alimentară.
- ✚ Cu toate acestea, este necesar un studiu suplimentar al acestor ingrediente pentru a demonstra eficacitatea lor asupra sănătății umane, cum ar fi efectele antidiabetice, antiinflamatorii, etc.

CAPITOLUL 14. CONTRIBUȚII ORIGINALE ȘI PERSPECTIVE PENTRU STUDII ULTERIOARE

14.1. Contribuții originale

În acest studiu, contribuțiile originale sunt:

- ✚ Extracția și analiza concentrațiilor de compuși biologic activi și activitatea antioxidantă a cojilor de vinete, foarte puțin studiate în literatură.
- ✚ Studiul parametrilor cinetici de degradare din perspectiva **structură-funcție-proces** pentru menținerea proprietăților biochimice în produsele prelucrate. Aceste informații despre factorii care duc la degradarea compușilor biologic activi din extractele de plante sunt necesare pentru optimizarea condițiilor proceselor industrial-tehnologice și minimizarea pierderii sau degradării componentelor bioactive cu rol funcțional.
- ✚ Studiul comportamentului compușilor bioactivi din extractele de coji de vinete în timpul digestiei cu scopul creșterii bioactivității și biodisponibilității acestora astfel încât să exercite posibile efecte benefice asupra organismului uman.
- ✚ Analiza prin spectroscopie de fluorescență a stabilității complexelor antociani-proteine în vederea formulării ingredientelor funcționale.
- ✚ Producerea de peptide din proteinele zerului cu proprietăți biologice și prebiotice.
- ✚ Formularea de ingrediente pe bază de compuși biologic activi din cojile de vinete, îmbogățite cu peptide și bacterii lactice, cu concentrații ridicate de compuși fitochimici și activitate antioxidantă care le asigură o bună stabilitate în sistemul gastrointestinal și eliberare controlată.
- ✚ Testarea pulberilor din matricele alimentare pentru a le evidenția calitatea și contribuția ca ingredient funcțional.

14.2. Perspective pentru continuare a studiilor

Perspectivile de continuare a studiilor sunt următoarele:

- ✚ Realizarea profilului colorimetric al pulberilor și produselor cu valoare adăugată.
- ✚ Testarea efectelor antidiabetice, antiinflamatorii, antihiperlipidemie și antitumorale ale pulberilor, întrucât acestea sunt o matrice complexă de compuși.
- ✚ Testarea produselor cu valoare adăugată din punct de vedere al proprietăților senzoriale.
- ✚ Studiul compușilor biologic activi din cojile de vinete tratate termic așa cum ar rezulta din industria conservelor și compararea rezultatelor cu cele obținute pe cojile netratate termic.
- ✚ Studiul evaluării siguranței alimentare a ingredientelor obținute din punct de vedere al contaminanților (pesticide, toxine, metale grele, microplastice). Transferul contaminanților de la materia primă la produsul valorizat trebuie de asemenea evaluat.

CAPITOLUL 15. DISEMINAREA REZULTATELOR

Diseminarea rezultatelor cercetării efectuate pe parcursul studiilor de doctorat a avut ca rezultat patru lucrări științifice publicare în jurnale cotate ISI și trei cereri de brevete astfel: **2 articole științifice în zona roșie – Q1, 1 articol științific în zona galbenă – Q2 și 1 articol indexat ISI.**

A. Articole

A.1. Articole ISI cu factor de impact

1. **Condurache Nina Nicoleta**, Croitoru Constantin, Enachi Elena, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta, Râpeanu Gabriela. *Eggplant peels as a valuable source of anthocyanins: Extraction, thermal stability and biological activities*. **Plants** **2021**, 10(3), pp. 1 – 17, DOI 10.3390/plants10030577, **Q1 – 3.935 factor impact (2020)**.
2. **Condurache Nina Nicoleta**, Aprodu Iuliana, Grigore-Gurgu Leontina, Petre Brindusa Alina, Enache Elena, Râpeanu Gabriela, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta. *Fluorescence spectroscopy and molecular modeling of anthocyanins binding to bovine lactoferrin peptides*. **Food Chemistry** **2020**, 318, 126508, DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126508>, **Q1 – 6.306 factor impact (2019)**.
3. **Condurache Nina Nicoleta**, Aprodu Iuliana, Crăciunescu Oana, Tatia Rodica, Horincar Georgiana, Barbu Vasilica, Enachi Elena, Râpeanu Gabriela, Bahrim Gabriela Elena, Oancea Anca, Stănciuc Nicoleta. *Probing the Functionality of Bioactives from Eggplant Peel Extracts Through Extraction and Microencapsulation in Different Polymers and Whey Protein Hydrolysates*. **Food and Bioprocess Technology** **2019**, 12, pp. 1316–1329, DOI <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02302-1>, **Q2 – 3.29 factor impact (2018)**.

A.2. Articole indexate ISI

1. **Condurache Nina Nicoleta**, Turturică Mihaela, Enachi Elena, Barbu Vasilica, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta, Croitoru Constantin, Râpeanu Gabriela. *Impact of wall materials on physico-chemical properties and stability of eggplant peels anthocyanin hydrogels*. **Inventions** **2021**, 6(3), 47, DOI 10.3390/inventions6030047, **indexat ISI**.

B. Cereri de brevet

1. **Condurache (Lazăr) Nina Nicoleta**, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta, Andronoiu Georgeta Doina, Bahrim Gabriela Elena. *Dessert sauce with the addition of microencapsulated powder from anthocyanin extract from eggplant peel (*Solanum melongena* L.) - value-added product and production technology*. **Cerere nr. înregistrare OSIM A/00532/2021**.
2. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela Elena, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta. *Multifunctional natural ingredients based on anthocyanin extracts from eggplant peels, co-microencapsulated lactic acid bacteria, and their applications*. **Cerere nr. înregistrare OSIM A/00481/2019**.
3. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela Elena, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta. *Microencapsulated ingredients based on anthocyanin extracts from eggplant husks and high-function bioactive whey peptides for use in the food industry*. **Cerere nr. înregistrare OSIM 25042/2018**.

C. Conferințe

C.1. Conferințe internaționale în România

1. **Condurache (Lazăr) Nina-Nicoleta**, Aprodu Iuliana, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta, Râpeanu Gabriela. *Eggplant peel anthocyanins as food enhancers*. „Dunarea de Jos” University of Galati Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS – UDJG, 9-10 June 2022, Galati, Romania.
2. **Condurache (Lazăr) Nina-Nicoleta**, Aprodu Iuliana, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta, Râpeanu Gabriela. *Functionalization of food through the incorporation of bioactive compounds from eggplant peels*. „Dunarea de Jos” University of Galati Scientific Conference of Doctoral Schools, 9-10 June 2022, Galati, Romania.
3. **Condurache (Lazăr) Nina Nicoleta**; Aprodu Iuliana; Bahrim Gabriela Elena; Stănciuc Nicoleta; Râpeanu Gabriela. *Anthocyanins and bioactive peptides based multifunctional ingredients: an integrative approach*. Dunarea de Jos University of Galati, The 10th International Symposium EuroAliment, Faculty of Food Science and Engineering, Galati 7-8 October 2021, online.
4. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela Elena, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta. *Ice cream enriched with microencapsulated bioactive compounds from eggplant peels and LAB*. Dunarea de Jos University of Galati, Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS – UDJG 10-11 June 2021, online.
5. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela Elena, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta. *Impact of wall materials on phytochemical properties and stability of peels anthocyanin hydrogels*. Dunarea de Jos University of Galati, Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS – UDJG 10-11 June 2021, online.
6. **Condurache (Lazăr) Nina Nicoleta**, Milea Stefania Adelina, Râpeanu Gabriela, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta. *Innovative natural ingredients with multiple functionalities and applications in the food and pharmaceutical fields*. Ingredients Show by Ro.aliment 17-21 May 2021, online.
7. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela Elena, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta. *“Natural ingredients with multiple functionality based on anthocyanin extracts from eggplant shells and comic encapsulated lactic acid bacteria and their applications”*. Ingredients Show Bucharest 5-9 October 2020, online.
8. **Condurache Nina Nicoleta**, Aprodu Iuliana, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta, Râpeanu Gabriela. *Studies on binding mechanism between phenolic compounds from eggplant peels and lactoferrin*. “Dunarea De Jos” University Of Galati, Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG 8th Edition 18-19 June 2020, online.
9. **Condurache Nina Nicoleta**, Enachi Elena, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta, Râpeanu Gabriela. *Influence of parameters on different extraction methods of anthocyanins from eggplant peels*. “Dunarea De Jos” University Of Galati, Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG 8th Edition 18-19 June 2020, online.
10. Milea Ștefania Adelina, **Condurache Nina Nicoleta**, Râpeanu Gabriela, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta. *Ingredients co-encapsulated with lactic acid bacteria and bioactive compounds*. International Expo-Conference Ingredients Show, 3rd Edition, 17-18 October 2019, Sinaia, Romania.
11. **Condurache Nina Nicoleta**, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta, Bahrim Gabriela Elena. *Functionality of ingredients obtained by microencapsulation of anthocyanins from eggplant peels with polisaccharides and bioactive peptides*. Dunarea de Jos University of Galati, Faculty of Food Science and Engineering, The 9th International Symposium EuroAliment 5-6 September 2019, Galati, Romania.

C.2. Conferințe naționale

1. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela Elena, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta. *Fluorescence quenching of whey proteins and peptides by eggplant peels’ anthocyanins*. Faculty of Food Engineering, Tourism and Environmental Protection Arad, Students Scientific Communication Session 18th Edition, 26-27 November 2020, online.
2. **Condurache Nina Nicoleta**, Râpeanu Gabriela, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta. *Anthocyanins from food by-products as alternative for synthetic additives? A big challenge for food and related industries*. “Spiru Haret” University of Bucharest, Second European One Health Conference 21-22 June 2019, Bucharest, Romania.
3. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta, Râpeanu Gabriela. *Bioactive compounds and antioxidant activity of extracts from eggplant peel using different extraction*

methods. "Dunarea de Jos" University of Galati, Scientific Conference of Doctoral Schools the 7th edition 13-14 June 2019, Galati, Romania.

D. Târguri de invenții

D.1. Târguri internaționale de invenții

1. **Condurache (Lazăr) Nina-Nicoleta**, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta, Andronoiu Doina Georgeta, Bahrim Gabriela-Elena. *Dessert topping with antioxidant activity and high fiber content*. *International Fair of Inventions and Innovations in the field of food "Inovaliment"* 2nd edition, 22-26 November, 2021, online.
2. **Condurache Nina-Nicoleta**, Bahrim Gabriela-Elena, Stănciuc Nicoleta, Andronoiu Doina, Râpeanu Gabriela. *Sweet sauce enriched with fiber and biologically active compounds from eggplant peel - A/00532*. Innovation and Research Salon "UGAL INVENT" 5th edition, 10-12 November, 2021, online.
3. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela-Elena, Stănciuc Nicoleta, Râpeanu Gabriela. *Natural ingredients with multiple functionality based on anthocyanin extracts from eggplant peels co-microencapsulated with lactic acid bacteria and their applications*. *International Fair of Inventions and Innovations in the field of food "Inovaliment"* 1st edition, 23-27 November 2020, online.
4. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela-Elena, Răpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta. *Natural ingredients with multiple functionality based on anthocyanin extracts from eggplant peels co-microencapsulated with lactic acid bacteria and their applications*. "INFOINVENT,, Specialized International Exhibition 16th Edition, 20 - 23 November 2019, Chisinau, Rep. Moldavia.
5. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela-Elena, Răpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta. *Natural ingredients with multiple functionality based on anthocyanin extracts from eggplant peels co-microencapsulated with lactic acid bacteria and their applications*. „Dunarea de Jos” University of Galati, „UGAL INVENT” innovation and research show, 16-18 October 2019, Galati, Romania.
6. **Condurache Nina Nicoleta**, Râpeanu Gabriela, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta. *Natural ingredients with multiple functionality based on anthocyanin extracts from eggplant peels co-microencapsulated with lactic acid bacteria and their applications*. Technical University “Gheorghe Asachi” of Iași and National Institute of Inventions Iasi (INI), The 23rd International Exhibition of inventics “Inventica” 26-28 June 2019, Iasi, Romania.

E. Premii și distincții

1. **Mențiune de onoare** la „Dunarea de Jos” University of Galati Scientific Conference of Doctoral Schools, 9-10 June 2022, Galati, Romania, cu lucrarea *Functionalization of food through the incorporation of bioactive compounds from eggplant peels*. **Condurache (Lazăr) Nina-Nicoleta**, Aprodu Iuliana, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta, Râpeanu Gabriela.
2. **Mențiune** la competiția “Awarding the research results of PhD students from IOSUD-UDJG” pentru articolul din 2021 *Eggplant peels as a valuable source of anthocyanins: extraction, thermal stability and biological activities*, publicat în jurnalul *Plants*. **Condurache (Lazăr) Nina-Nicoleta**, Croitoru Constantin, Enachi Elena, Bahrim Gabriela-Elena, Stănciuc Nicoleta, Râpeanu Gabriela.
3. **Medalie de argint** la „Dunarea de Jos” University of Galati, „UGAL INVENT” Innovation and Research show, 10-12 November 2021, Galati, Romania, pentru lucrarea *Sweet sauce enriched with fibers and biologically active compounds from eggplant peels*. **Condurache (Lazăr) Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta, Andronoiu Georgeta Doina.
4. **Premiul I** la “Dunarea de Jos” University of Galati, Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS – UDJG, 10-11 June 2021 pentru lucrarea *Ice cream enriched with microencapsulated bioactive compounds from eggplant peels and LAB*. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela Elena, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta.
5. **Diplomă de excelență** la Gala CEREX pentru rezultate excelente în activitatea de cercetare din cadrul Universității „Dunărea de Jos” din Galați.

6. **Premiul I** la concursul "Awarding the research results of PhD students from IOSUD-UDJG" în 2020 pentru articol *Fluorescence spectroscopy and molecular modeling of anthocyanins binding to bovine lactoferrin peptides*, publicat în jurnalul Food Chemistry.
7. **Premiul Special** la Târgul Internațional de Invenții și Inovații în domeniul alimentar "Inovaliment" 1st edition, November 23-27, 2020 pentru lucrarea *Natural ingredients with multiple functionality based on anthocyanin extracts from eggplant peels co-microencapsulated with lactic acid bacteria and their applications*. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta, Râpeanu Gabriela.
8. **Premiul II** la secțiunea postere la Students Scientific Communication Session 18th Edition, Faculty of Food Engineering, Tourism and Environmental Protection Arad, November 26-27, 2020 pentru lucrarea *Fluorescence quenching of whey proteins and peptides by eggplant peels' anthocyanins*. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela Elena, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta.
9. **Medalie de aur** la International Specialized Exhibition "Infoinvent" 16th edition, Chisinau, Rep. Moldova, November 20-23, 2019 pentru lucrarea *Natural ingredients with multiple functionality based on anthocyanin extracts from eggplant peels co-microencapsulated with lactic acid bacteria and their applications*. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela, Răpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta.
10. **Premiul II** la International Expo-Conference Ingredients Show, 3rd Edition, 17-18 October 2019, Sinaia pentru lucrarea *Ingredients co-encapsulated with lactic acid bacteria and bioactive compounds*. Milea Ștefania Adelina, **Condurache Nina Nicoleta**, Râpeanu Gabriela, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta.
11. **Mențiune** la Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG 8th Edition, "Dunarea De Jos" University Of Galati, 18-19 June 2019 pentru lucrarea *Studies on binding mechanism between phenolic compounds from eggplant peels and lactoferrin*. **Condurache Nina Nicoleta**, Aprodu Iuliana, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta, Râpeanu Gabriela.
12. **Premiul II** la Scientific Conference of Doctoral Schools the 7th edition, "Dunarea de Jos" University of Galati, 13th-14th June 2019 pentru lucrarea *Bioactive compounds and antioxidant activity of extracts from eggplant peel using different extraction methods*. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta, Râpeanu Gabriela.
13. **Premiul Prof. Constantin Moraru** pentru lucrarea *Bioactive compounds and antioxidant activity of extracts from eggplant peel using different extraction methods*. **Condurache Nina Nicoleta**, Bahrim Gabriela Elena, Stănciuc Nicoleta, Râpeanu Gabriela.

F. Proiecte de cercetare

1. 31.05.2022 - 15.12.2022. **Asistent de cercetare** în proiectul „*Innovative strategies for capitalizing agri-food by-products into products with economic value promoting the principles of the circular economy*”, contract nr. 14888/11.05.2022.
2. 01.03.2021 – 31.12.2023. **Asistent de cercetare** în proiectul "New emerging concepts for food functionalization, through the transition from probiotics to metabiotics, as a health promotion strategy (BIOTICS +)", contract nr. PCE 159/2021.
3. 08.10.2021 – 30.09.2022. **Asistent de cercetare** în proiectul „*Innovative and emerging solutions for the design of natural co-microcomposites to improve food functionality*”, contract nr. RF 3637/30.09.2021.
4. 01.07.2018 – 15.09.2020. **Asistent de cercetare** în proiectul PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-056, 10PCCDI/2018 PRO-SPER „Closing value chains in the bioeconomy by obtaining innovative bioproducts required by the market” Project 3 - Tribotic products - probiotics, prebiotics, postbiotics - with multiple uses, obtained from by-products from the industrialization of vegetables – 3-4Life.

Teza de doctorat a fost realizată în cadrul proiectului „Program de creștere a performanței și inovației în cercetarea doctorală și postdoctorală de excelență – PROINVENT” Contract nr. 62487/06.03.2022, POCU/993/6/13 - Cod SMIS: 153299.

Axa prioritară 6- Educație și competențe

Titlul proiectului: „Program pentru creșterea performanței și inovării în cercetarea doctorală și postdoctorală de excelență - PROINVENT”

Contract nr: 62487/03.06.2022 POCU/993/6/13 - Cod SMIS: 153299

Punctele de vedere exprimate în lucrare aparțin autorului și nu angajează Comisia Europeană și Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați, beneficiara proiectului.