

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT

CERCETĂRI BIOTEHNOLOGICE PRIVIND OBTINEREA ȘI CARACTERIZAREA FILMELOR FUNCȚIONALE BIOEDIBILE

Doctorand,

Marian NECULAU

Conducător științific,

Prof.dr.ing. Camelia VIZIREANU

Seria I 1 Biotehnologii Nr. 11

GALAȚI

2020

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT

**CERCETĂRI BIOTEHNOLOGICE PRIVIND OBȚINEREA ȘI
CARACTERIZAREA FILMELOR FUNCȚIONALE BIOEDIBILE**

(Rezumat teză de doctorat)

Doctorand

Marian NECULAU

Președinte

Prof univ.dr.ing. Gabriela Elena BAHRIM.

Conducător științific,

Prof univ.dr.ing. Camelia VIZIREANU

Referenți științifici

Prof univ.dr.hab.ing. Nicoleta Gabriela HĂDĂRUGĂ

Prof univ.dr.hab.ing. Georgiana Gabriela CODINĂ

Prof univ.dr.hab.ing. Iuliana APRODU

Seria I 1 Biotehnologii Nr.11

GALAȚI

2020

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 agicultură și dezvoltare rurală**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE SOCIALE

- Seria E 1: **Economie**
- Seria E 2: **Management**
- Seria SSEF: **Știința sportului și educației fizice**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE UMANISTE ȘI ARTE

- 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 BIOLOGICE ȘI BIOMEDICALE

- Seria M: **Medicină**

CUPRINS

| | |
|---|-----------|
| Obiective științifice și justificarea alegerii temei..... | 7 |
| I. Studiul documentar..... | 12 |
| 1. Stadiul actual al cunoașterii în domeniul hidrocoloizilor utilizați la obținerea filmelor funcționale bioedibile..... | 12 |
| 1.1. Definierea și aplicarea hidrocoloizilor..... | 12 |
| 1.2. Clasificarea și utilizarea hidrocoloizilor..... | 13 |
| 1.2.1. Alginatul de sodiu..... | 16 |
| 1.2.2. Carboximetil celuloza..... | 23 |
| 1.2.3. Carrageenanul..... | 25 |
| 1.2.4. Konjac mannan-ul..... | 27 |
| 1.3. Prezentarea substanțelor bioactive utilizate în experimentări..... | 28 |
| 1.3.1. Preparat fermentat pe bază de ceapă..... | 28 |
| 1.3.2. Extract de drojdie..... | 30 |
| 1.3.3. Tulpină probiotică de <i>Bacillus subtilis</i> CU1..... | 32 |
| 1.4. Utilizarea actuală a hidrocoloizilor și substanțelor bioactive în obținerea filmelor funcționale bioedibile..... | 35 |
| II. Caracterizarea fizico-chimică și reologică a hidrocoloizilor utilizați pentru obținerea filmelor funcționale bioedibile..... | 37 |
| 2. Introducere..... | 37 |
| 2.1. Materiale, aparatură și metode de analiză utilizate în experimentări..... | 38 |
| 2.1.1. Determinarea pH-ului..... | 39 |
| 2.1.2. Determinarea umidității..... | 39 |
| 2.1.3. Capacitatea de reținere a apei..... | 39 |
| 2.1.4. Determinarea densității volumetrice și presate..... | 40 |
| 2.1.5. Determinarea Indicelui Carr și Rației Hausner..... | 40 |
| 2.1.6. Capacitatea de reținere a umidității..... | 40 |
| 2.1.7. Determinarea cenușii totale..... | 41 |
| 2.1.8. Determinarea vâscozității cu ajutorul reometrului..... | 41 |
| 2.1.9. Determinarea tăriei gelului..... | 41 |
| 2.1.10. Determinarea profilurilor reologice ale biopolimerilor analizați..... | 42 |
| 2.1.11. Determinarea vâscozității prin metoda cupelor vâscozimetrice în funcție de concentrația soluției și timpul de curgere..... | 42 |
| 2.2. Rezultate și discuții..... | 43 |
| 2.3. Concluzii parțiale..... | 57 |
| Bibliografie..... | 59 |
| III. Studiul filmelor funcționale bioedibile pe bază de alginat de sodiu..... | 65 |
| 3.1. Introducere..... | 65 |
| 3.2. Materiale, metode de analiză și aparatura utilizată în experimentări..... | 68 |
| 3.2.1. Materiale..... | 68 |
| 3.2.2. Metode de analiză și aparatura utilizată în experimentări..... | 69 |
| 3.2.2.1. Reologia filmelor pe bază de alginat..... | 69 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.2.2.Capacitatea antioxidantă a ingredientelor bioactive..... | 69 |
| 3.2.2.3.Analiza microbiologică a filmelor pe bază de alginat..... | 69 |
| 3.2.2.4.Determinarea grosimii și culorii filmelor bioedibile pe bază de alginat cu ingredientele bioactive încorporate..... | 74 |
| 3.2.2.5.Reprezentarea tridimensională a culorii filmelor pe bază de alginat..... | 75 |
| 3.2.2.6.Permeabilitatea filmelor bioedibile pe bază de alginat..... | 76 |
| 3.2.2.7.Analiza EDS/SEM..... | 78 |
| 3.2.2.8.Analiza FTIR..... | 79 |
| 3.2.2.9.Proiectarea experimentală..... | 79 |
| 3.3. Rezultate și discuții..... | 83 |
| 3.4. Concluzii parțiale privind studiul filmelor bioedibile pe bază de alginat..... | 119 |
| Bibliografie..... | 122 |
| | |
| IV. Obținerea experimentală a unui baton vegetal umplut în membrană de alginat cu ingredientele bioactive încorporate..... | 127 |
| 4.1. Introducere..... | 127 |
| 4.2. Stadiul actual al cunoașterii în domeniul produselor vegetale și caracteristicile acestora...128 | 128 |
| 4.3. Procedeele de obținere a unui baton vegetal în membrană de alginat cu ingrediente bioactive încorporate..... | 132 |
| 4.4. Materiale și metode..... | 134 |
| 4.4.1. Materiale..... | 134 |
| 4.4.2. Analiza fizico chimică..... | 139 |
| 4.4.3. Analiza microbiologică..... | 140 |
| 4.4.4. Analiza senzorială..... | 142 |
| 4.4.5. Analiza SWOT..... | 143 |
| 4.5. Rezultate și discuții..... | 143 |
| 4.6. Concluzii parțiale..... | 155 |
| Bibliografie..... | 158 |
| | |
| V. Concluzii generale, perspective și contribuții personale..... | 162 |
| Concluzii generale..... | 162 |
| Diseminarea rezultatelor cercetării..... | 167 |
| CV-Marian Neculau..... | 169 |
| Anexe..... | 178 |

Cuvinte cheie: biofilm comestibil, biopolimeri, *Bacillus subtilis*, extract de drojdie, preparat fermentat pe bază de ceapă, activitate antioxidantă.

Obiective științifice și justificarea alegerii temei

Alimentele sunt susceptibile în mod natural la degradarea fizică, chimică și microbiologică care are loc în timpul depozitării și distribuției acestora. Aceste modificări variază în funcție de compoziția alimentelor și parametrii mediului, putând afecta semnificativ calitatea produselor. Ambalarea ocupă o poziție centrală în tehnologia produselor alimentare (Siracusa et al., 2008). Alegerea adecvată a materialelor și sistemelor de ambalare reprezintă o parte integrantă a procesului de obținere a alimentului și designul acestuia. Lawless et al. (2013) identifică patru roluri cheie ale ambalajelor: înveliș/suport, protecție, ușurință în utilizare și comunicare. De fapt, fiecare din aceste roluri cuprinde un număr de obiective diferite: tehnologice, inginerești și comerciale.

Marii producători de utilaje alimentare, împreună cu producătorii de ingrediente și aditivi, investesc continuu sume impresionante în cercetare pentru dezvoltarea de soluții inovatoare în vederea obținerii unor produse finite cu un nivel ridicat al calității și cât mai prietenoase cu mediul. În multe țări subdezvoltate economic, Organizația Mondială a Sănătății a identificat că un procent între 30% și 50% din produsele alimentare sunt risipite datorită modalităților inadecvate de conservare și protecție, spre deosebire de țările cu economii dezvoltate unde procentul se reduce până la 2-3% (incpen.org, 2016). Aici regăsim și motto-ul companiei Tetra Pack- „un ambalaj trebuie să economisească mai mult decât costul său” (tetralaval.com, 2016).

Studiul intitulat “**Cercetări biotehnologice privind obținerea și caracterizarea filmelor funcționale bioedibile**” urmărește obținerea și aplicarea filmelor funcționale bioedibile având ca ingrediente de bază hidrocoloizi (polizaharide ușor dispersabile în apă) precum: alginatul de sodiu, carboximetil celuloza, carrageenanul și guma Konjac. Filmele astfel obținute vor servi drept matrice suport pentru ingrediente bioactive precum extractul de drojdie, preparatul fermentat pe bază de ceapă și pentru o tulpină cu proprietăți speciale de *Bacillus subtilis* CU1, ce vor reprezenta partea funcțională a acestui film.

Adaosul de extracte bioactive sau de microorganisme probiotice selecționate în scopul îmbunătățirii valorii intrinseci a produselor alimentare reprezintă o practică tot mai uzuală. Cercetătorii din domeniul industriei alimentare își îndreaptă atenția către încorporarea unor compuși biologic activi în filme bioedibile, mai ales cu scopul prelungirii duratei de valabilitate a alimentelor (Falguera et al., 2011).

Un film sau un înveliș biobioedibil a fost definit ca un strat subțire continuu de material comestibil format pe suprafața alimentului sau între diverse straturi ale unui aliment sau componente alimentare. Pe lângă faptul că acționează ca o barieră de protecție, filmele biobioedibile pot fi folosite ca suport pentru compuși bioactivi, astfel măbind proprietățile funcționale ale produsului alimentar datorită beneficiilor aduse acestuia (Embuscado et al., 2009). Aceste filme sunt caracterizate ca filme flexibile, subțiri, obținute din polimeri naturali de origine animală sau vegetală care servesc, din punct de vedere funcțional, ca matrice suport pentru substanțele bioactive.

Scopul filmelor biobioedibile este de a asigura un rol multiplu alimentului pe care îl deservește. Pot fi enumerate cel puțin patru caracteristici definitorii ale acestor filme:

- Scop de protecție a alimentului ca înveliș principal protector,
- Scop de matrice pentru încorporarea diferitor substanțe bioactive,
- Avantaje economice superioare comparativ cu alte produse concurente de pe piață,
- Scop funcțional de prelungire a valabilității produsului și îmbunătățire a principalelor proprietăți senzoriale ale acestuia.

Activitățile de cercetare din cadrul tezei au fost realizate cu ajutorul infrastructurii și a resurselor din cadrul următoarelor instituții:

- Departamentul de Știința Alimentelor, Ingineria Alimentelor, Biotehnologii și Acvacultură, din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea Dunărea de Jos din Galați.
- Laboratorul de Cercetare pentru Alimente din cadrul Institutului de Bioresurse Alimentare din București.
- Stația pilot de carne din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea Dunărea de Jos din Galați.
- Laboratorul din cadrul companiei Kuk Romania SRL.
- Fabrica de procesare produse vegetale, Sano Vita din localitatea Vlădești, Râmnicu Vâlcea.

Structura tezei de doctorat:

- 1- Studiul documentar** prezintă următoarele informații: stadiul actual al cunoașterii în domeniul hidrocoloizilor utilizați la obținerea filmelor funcționale bioedibile; caracterizarea principalelor elemente componente ale filmelor bioedibile și definirea exactă a noțiunii de film bioedibil precum și istoricul filmelor pe bază de alginat de sodiu.
- 2- Studiul privind caracterizarea materiilor prime și materialelor de bază** folosite pentru obținerea filmelor mono-strat urmând a se stabili și o relație între principalii hidrocoloizi pentru a îmbunătăți caracteristicile acestora. Fiecare hidrocoloid în parte a fost analizat minuțios în vederea corelării proprietăților acestuia cu necesitatea și dozajul optim rețetei unui film biobioedibil. Stabilirea rezistenței la rupere a filmului în funcție de grosimea acestuia și stabilirea diametrului maxim aplicabil în funcție de produsul pe care va fi utilizat.
- 3- Studiul referitor la obținerea acestor filme și înglobarea de substanțe bioactive** (preparatul fermentat pe bază de ceapă, extractul de drojdie și o tulpină cu proprietăți speciale de de *B. subtilis* CU1) în vederea îmbunătățirii proprietăților filmului și totodată în vederea îmbunătățirii caracteristicilor produsului finit. Studiul experimental constă în analize de culoare și grosime a filmului, analiza permeabilității vaporilor de apă, analiza Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDX) și Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) pentru a studia morfologia internă a membranei obținute. Proiectarea unui amestec optim de hidrocoloizi cu adaos de substanțe active pentru îmbunătățirea calității filmului, care să aibă parametri fizici la valori optime constituie un obiectiv esențial al cercetării desfășurate pentru elaborarea tezei de doctorat. În acest sens am aplicat o abordare sistematică de investigare a procesului, bazată pe proiectarea statistică a experimentelor (Design of Experiments - DOE). Utilizarea acestei tehnici necesită dezvoltarea unui model de proiectare care permite evaluarea parametrilor calitativi ai produsului finit în funcție de factorii care îi influențează. Astfel, în etapele experimentului (în analiza statistică a modelelor matematice) se utilizează ca proceduri statistice analiza de varianță (Analysis of Variance - ANOVA) și analiza de regresie (Regression Analysis). Designul experimental bazat pe Optimal-I Mixture Design a fost construit utilizând softul State-Ease Design Expert 11.0 al companiei CAMO, Norvegia.
- 4- Obținerea și aplicarea filmului funcțional bioedibil pe suprafața unor matrice alimentare complexe de tip baton vegetal.** În această parte a tezei au fost realizate analize microbiologice pentru două matrici: un baton vegetal ambalat în membrană de collagen/poliamică și batonul vegetal ambalat în filmul bioedibil

funcțional. Analiza fizico-chimică a ambelor produse a fost realizată în paralel cu ajutorul aparaturii de laborator.

Pentru obținerea produselor descrise anterior au fost folosite ingrediente funcționale precum alginat de sodiu, carrageenan, carboximetil celuloză, guma Konjac care sunt la bază polizaharide derivate din alge. Acești hidrocoloizi prezintă numeroase aplicații în industriile alimentară, farmaceutică, cosmetică, în operații biotehnologice industriale și altele, fiind folosiți ca agenți de gelificare, substanțe de îngroșare sau agenți de stabilizare și emulsionare. Alginatul și carrageenanul provin din două familii de alge diferite: carrageenanul este produs de caragenofite din grupul *Rhodotophyta*, iar alginatul de alge brune din familia *Phaeophyta* (Draget et al., 2009).

Prezentul studiu a avut ca obiectiv principal stabilirea unei metode de obținere a unui biofilm având ca matrice alginatul de sodiu și alți hidrocoloizi în care s-au adăugat, în proporții diferite, preparat fermentat pe bază de ceapă, extract de drojdie și cultură pură de bacterii din genul *Bacillus* ssp. *subtilis*. În vederea atingerii scopului propus au fost urmărite următoarele obiective specifice:

- Studierea și caracterizarea materiilor prime și materialelor de bază folosite pentru obținerea filmelor mono-strat urmând a se stabili și o relație între principalii hidrocoloizi pentru a îmbunătăți caracteristicile acestora
- Evaluarea posibilității de obținere a unui film bioedibil și de înglobare în aceste filme polimerice a substanțelor bioactive (preparat fermentat pe bază de ceapă, extractul de drojdie și o tulpină cu proprietăți speciale de *Bacillus subtilis* CU1 înregistrat cu numărul I-2745 în colecția națională de culturi de microorganisme, CNCM) în vederea îmbunătățirii proprietăților filmului și totodată în vederea îmbunătățirii caracteristicilor produsului finit.
- Studierea proprietăților funcționale ale filmului bioedibil obținut și evaluarea funcționalității acestuia în matrice film-aliment.

Filmele obținute au fost evaluate din punct de vedere microbiologic, urmărindu-se și capacitatea antioxidantă *in vitro*. Proiectarea unui amestec optim pentru obținerea unui film optimizat s-a realizat cu ajutorul programului DOE- Design of Experiments, Camo, Norvegia, optimizarea urmărind atingerea unui echilibru între performanță, calitate și cost (Melis, T., 1989).

Teza de doctorat conține 221 de pagini și este structurată în patru părți distincte: „*studiul documentar*” prezentat în 30 de pagini (10 figuri și 4 tabele), „*studiul privind caracterizarea materiilor prime și materialelor de bază*” care conține 26 de pagini (15 figuri și 1 tabel), „*studiul referitor la obținerea filmelor cu ingrediente bioactive încorporate*” care conține 58 de pagini (27 figuri și 22 tabele) și „*studiul referitor la obținerea și aplicarea filmului funcțional bioedibil pe suprafața unor matrici alimentare complexe de tip baton vegetal*” care conține 32 de pagini (8 figuri și 7 tabele), concluziile, diseminarea rezultatelor și anexele aferente ce conțin 58 de pagini.

Bibliografia acestei lucrări a fost trecută la sfârșitul fiecărui capitol în parte și însumează un total de 16 pagini cu majoritatea referințelor citate după anul 2010 pentru a releva noutățile din acest domeniu.

II. Caracterizarea fizico-chimică și reologică a hidrocoloizilor utilizați pentru obținerea filmelor funcționale bioedibile

2.1. Introducere

Acest capitol include studiul privind caracterizarea materiilor prime și materialelor de bază folosite pentru obținerea filmelor mono-strat urmând a se stabili și o relație între principalii hidrocoloizi pentru a îmbunătăți caracteristicile acestora. Fiecare hidrocoloid în parte a fost analizat minuțios în vederea corelării proprietăților acestuia cu necesitatea și dozajul optim rețetei unui film bioedibil. Stabilirea rezistenței la rupere a filmului în funcție de grosimea acestuia și stabilirea diametrului maxim aplicabil în funcție de produsul pe care va fi utilizat.

2.2. Materiale, aparatură și metode de analiză utilizate în experimentări

Materiale

În prezentul studiu au fost realizate determinări privind comportamentul reologic a patru soluții poliglucidice după cum urmează:

P1 - CMC-carboximetil-celuloză, denumire comercială produs: 7H9, producător Ashland, SUA.

P2 - Alginat de sodiu, denumire comercială produs: Ferwo Alginate F400, producător Caldic Ingredients, Rotterdam, Olanda.

P3 – Kappa-carrageenan rafinat, denumire comercială produs: BLK 1120, producător BLG-Brilliant Gum, Shanghai, China.

P4 - Konjac mannan, denumire comercială produs: MRA, producător Food Ingredients & Solutions, Olanda.

Aparatura utilizată: pH-metru, tip Metrohm, Elveția; balanță analitică, tip Kern ADB 200-4, Germania; mixer vertical Phillips, China; cuptor de calcinare, Proteherm PAF 110/6, Germania; centrifugă Funke Gerber, Germania; cilindru gradat de 100 mL, Isolab, DIN/ISO clasa B, Germania; pâlnie de sticlă, diametrul 55mm, Isolab, Germania; pahare Berzelius de 400 mL, Isolab, Germania; cutii Petri, diametrul 90 cm, Isolab, Germania; exsicator cu granule, Marienfeld, Germania; creuzete 50 mL, formă înaltă, Isolab, Germania; bec de gaz; rheometru AR 2000, TA Instruments, USA; Placă Peltier ca accesoriu al Rheometrului AR 2000; cupă vâscozimetrică cu orificii interschimbabile de la TQC Instruments, Olanda; orificiu cupă vâscozimetrică Tip 4, Standard DIN; trepied susținere cupă vâscozimetrică, TQC, Olanda; cronometru electronic, Isolab, Germania.

Investigațiile au urmărit:

- Caracterizarea fizico-chimică și senzorială a biopolimerilor
- Determinarea parametrilor reologici ai hidrocoloizilor analizați
- Influența concentrației asupra vâscozității soluțiilor de hidrocoloizi

2.3. Rezultate și discuții

a. Caracterizarea fizico-chimică și senzorială a biopolimerilor

În tabelul 2.1. sunt indicate valorile fizico-chimice ale probelor analizate. Probele se prezintă sub formă de pulbere fină cu granulație mică, sub valoarea de 90 μm. Culoarea acestora variază de la alb murdar până la cafeniu, în funcție de materia primă de la care se pornește pentru obținerea acestora. Pentru probele P3 și P4 nuanțele de alb închis și cafeniu

sunt specifice pulberilor de alge care stau la baza acestor materii prime. În cazul pH-ului se remarcă o valoare ridicată de 9,15 unități pentru P4, datorită metodei de obținere a hidrocoloizilor.

Tabel 2.1. Valorile caracteristicilor fizico-chimice și organoleptice ale probelor analizate

| Parametrul analizat | CMC | Alginat | Carrageenan | Konjac manan |
|---|------------|------------|-------------|--------------|
| Aspect | Pudră fină | Pudră fină | Pudră fină | Pudră |
| Culoare | alb murdar | alb | alb închis | cafeniu |
| pH | 8,02±0,04 | 7,61±0,06 | 7,40±0,07 | 9,15±0,07 |
| Umiditate (%) | 4,97±0,01 | 7,07±0,02 | 6,75±0,01 | 8,51±0,01 |
| Densitate volumetrică (g/ml) | 0,58±0,02 | 0,62±0,05 | 0,62±0,02 | 0,62±0,01 |
| Densitate presată (g/ml) | 0,78±0,03 | 0,84±0,02 | 0,94±0,06 | 0,95±0,07 |
| Indexul lui Carr (%) | 24,70±0,09 | 26,25±0,13 | 33,33±0,12 | 34,78±0,16 |
| Rația lui Hausner | 1,32±0,12 | 1,35±0,15 | 1,50±0,17 | 1,53±0,14 |
| Capacitatea de reținere a apei (%) | 12,46±0,12 | 12,17±0,15 | 13,73±0,16 | 12,00±0,11 |
| Vâscozitatea soluție 1% (cSt) | 26,67±1,25 | 43,67±0,94 | 16,67±1,25 | 682±2,45 |
| Cenușa (%) | 0,95±0,01 | 0,65±0,02 | 0,66±0,01 | 0,22±0,03 |

Toate valorile reprezintă Medii ± Deviația standard, n=3, (p<0,05).

În cazul P2 și P3 au fost înregistrate valori similare ale pH-ului, valori apropiate de pH neutru. Rezultate similare au fost raportate și de către [Belalia et al. \(2014\)](#) pentru alginatul de sodiu. Pentru fiecare hidrocoloizid în parte, valorile pH-ului au fost semnificativ diferite (p<0,05) pe linie cu variații mari de pH de la 7,40 la 9,15 unități. Umiditatea probelor diferă în funcție de metoda aplicată de producător pentru a usca hidrocoloizii analizați. Astfel, valoarea cea mai ridicată a umidității de 8,51% se înregistrează la P4, în timp ce proba cu cea mai mică umiditate o are proba P1 cu o valoare de 4,97%. În cazul analizei capacității de reținere a apei s-au obținut valori similare pentru probele P1, P2 și P4 de aproximativ 12%. O valoare mai mare a fost marcată de P3 (de circa 13,73%) datorită structurii specifice a carrageenanului și modului de obținere și standardizare al acestuia cu ajutorul sărurilor de potasiu ([Bixler, Porse, 2011](#)).

Valorile vâscozității probelor P1-P4 se încadrează în parametrii normali pentru acești hidrocoloizi pentru o concentrație a soluției de 1%, valori similare fiind notate și de [Laaman \(2011\)](#), deși pentru determinarea vâscozității hidrocoloizilor au fost înregistrate diferențe ale valorilor obținute datorită diverselor procedee și echipamente utilizate. Vâscozitatea probelor analizate sub formă de soluție 1% a înregistrat valori apropiate pentru P1, P2 și P3. În cazul probei P4, vâscozitatea a atins o valoare de 682 cSt datorită abilității gumei Konjac de a forma geluri.

b. Determinarea parametrilor reologici ai hidrocoloizilor analizați

În Figurile 2.2. și 2.3. sunt reprezentate curbele de curgere ale dispersiilor și gelurilor analizate pentru probele de alginat de sodiu (AL) și carboximetilceluloză (CMC). Din figura 2.2. se observă că, din punct de vedere reologic, proba de alginat a manifestat un comportament diferit comparativ cu proba de CMC prin valori diferite ale vâscozității gelurilor. În acest caz, la viteze mici de forfecare, până la 0,5 s⁻¹, gelul de alginat a prezentat un comportament dilatant (vâscozitatea a crescut de la 0,7 Pa·s la 0,9 Pa·s). Mai mult, valoarea vâscozității a putut fi recuperată pe curba de întoarcere doar până la viteza de 2 s⁻¹, după care, la viteze foarte mici de forfecare, vâscozitatea gelului de alginat a scăzut constant, până la o valoare finală de aproximativ 0,45 Pa·s, mult mai mică decât cea înregistrată la viteze mari de forfecare, subliniind astfel caracterul dilatant al gelului. În general, soluțiile de alginat de sodiu au tendința

de a fi foarte vâscoase. Astfel, comportamentul gelului de alginat la viteze de forfecare mari ($\dot{\gamma} > 10^2 \text{ s}^{-1}$) face din acesta un material potrivit pentru filme bioedibile datorită vâscozității reduse a materialului după acest punct ($\eta = 0,55 \text{ Pa}\cdot\text{s}$).

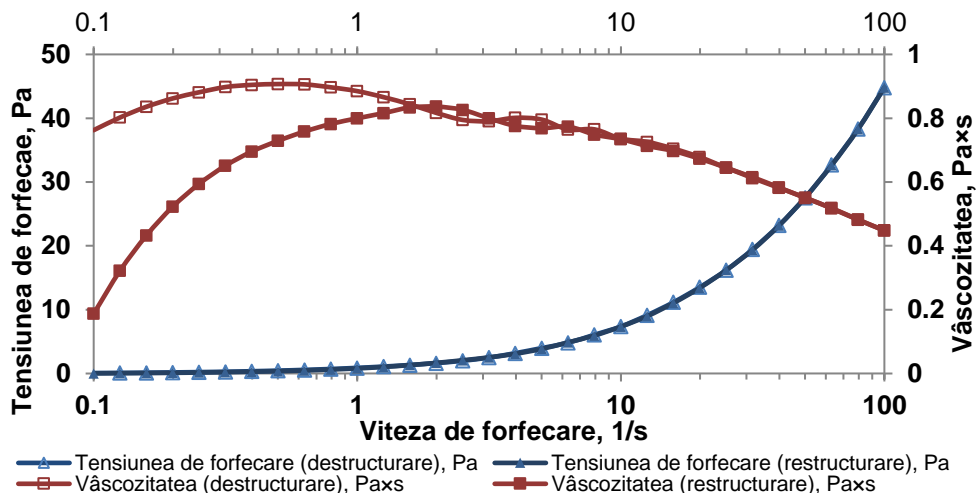


Figura 2.2. Variația parametrilor reologici (η și γ) pentru probele de alginat. Curbele de curgere pentru gelul format.

Figura 2.3. prezintă profilele reologice ale probelor de CMC sub forma curbelor de curgere în reprezentare semilogaritmă pentru vâscozitatea exprimată în $\text{Pa}\cdot\text{s}$ și viteza de forfecare exprimată în s^{-1} . Rezultatele au indicat caracterul pseudoplastic al gelului (scăderea vâscozității odată cu creșterea vitezei de forfecare), dar valoarea vâscozității a putut fi recuperată pe curba de restructurare a probei de CMC până la valoarea de $0,1 \text{ s}^{-1}$ (la viteze de forfecare foarte mici) depășind astfel valoarea inițială a vâscozității de $55,83 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. De asemenea, s-a putut observa fenomenul de histerzis, dar a cărui arie a fost relativ mică (între valorile de $17,69 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ și $30,84 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ pe curba de restructurare a vâscozității). Rezultate similare care atestă abilitatea CMC de a fi un bun agent de reticulare în obținerea filmelor bioedibile au fost remarcate și de către [Mu et al. \(2012\)](#).

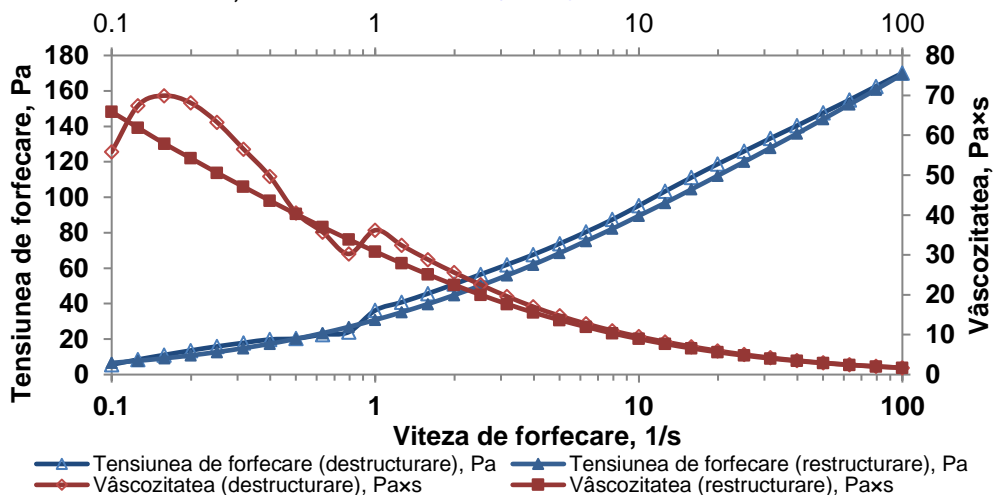


Figura 2.3. Variația parametrilor reologici (η și γ) pentru probele de CMC. Curbele de curgere pentru gelul format.

Vâscozitatea probei de CMC ajunge la valoarea 0 în condiții de tensiune de forfecare maximă la o valoare estimată de 170 Pa . Astfel, proba analizată reprezintă un ingredient potrivit pentru obținerea filmelor bioedibile în condițiile aplicării torsiunii maxime.

În figurile 2.4., 2.5., 2.6. și 2.7. au fost reprezentate profilele reologice ale probelor de alginat, CMC, carrageenan și Konjac prin testul de scanare al frecvenței gelurilor.

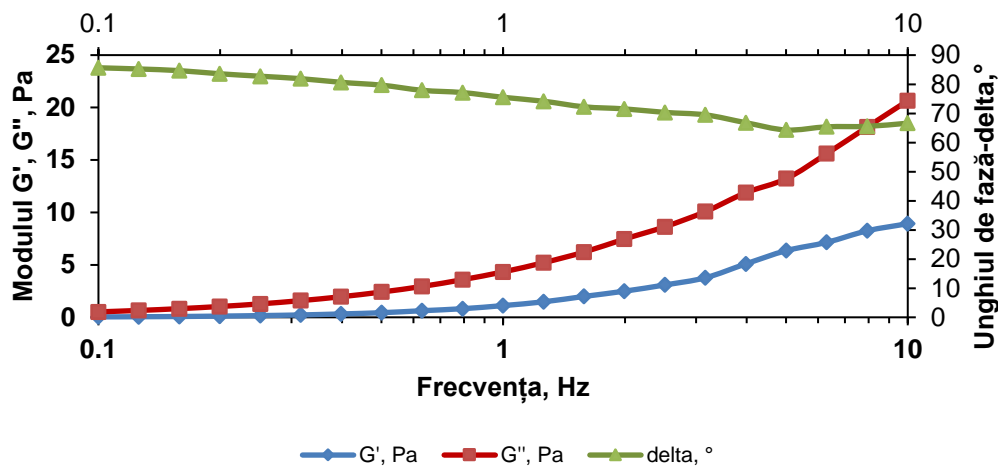


Figura 2.4. Variația parametrilor reologici (G' , G'' și δ) pentru probele de alginat. Testul de scanare a frecvenței gelului.

În figura 2.4. în cazul testului de scanare a frecvenței s-a putut observa un comportament în care valorile modulului de vâscozitate G'' au fost superioare valorilor modulului elastic G' , marcând astfel caracterul vâscos al materialului. În prima parte a domeniului de frecvență, până la valoarea de 1 Hz, atât modulul elastic, cât și modulul vâscos evoluează constant cu variații mici ale valorilor încadrate la 1,1 Pa și respectiv 4,3 Pa, urmând ca după această frecvență, până la finalul testului, să se înregistreze valori maxime de 8,9 Pa și respectiv 20 Pa pentru cele două module. Astfel, cu cât crește frecvența, Hz, pe domeniul de analiză, cu atât cresc și modulele G' și G'' pentru proba de alginat, ceea ce poate fi corelat cu o creștere a numărului de lanțuri libere finale de alginat datorită dimerizării (reacție chimică principală de combinare a doi radicali liberi) aleatorii ale acestora în rețeaua eterogenă (Palmer et al., 2014). Probele de alginat manifestă un comportament vâscoelastic în acest caz. În cazul testului de scanare a frecvenței s-a observat evoluția modulelor de vâscoelasticitate G' și G'' .

În Figura 2.5. odată cu creșterea frecvenței, gelul de CMC a devenit mai elastic, având un G' cu valori mai ridicate, componenta vâscoasă a gelului de CMC fiind inferioară modulului elastic, crescând într-un ritm mult mai redus. Pentru frecvențe mici ale amplitudinii oscilațiilor (impusă la 1%), de la 0,1 până la 0,2 oscilații pe secundă, componenta vâscoasă a avut valori mai mari decât componenta elastică, ceea ce poate fi tradus prin faptul că, în condiții quasi-stactice, gelul de CMC este mai mult vâscos decât elastic, comportându-se ca un fluid (curge).

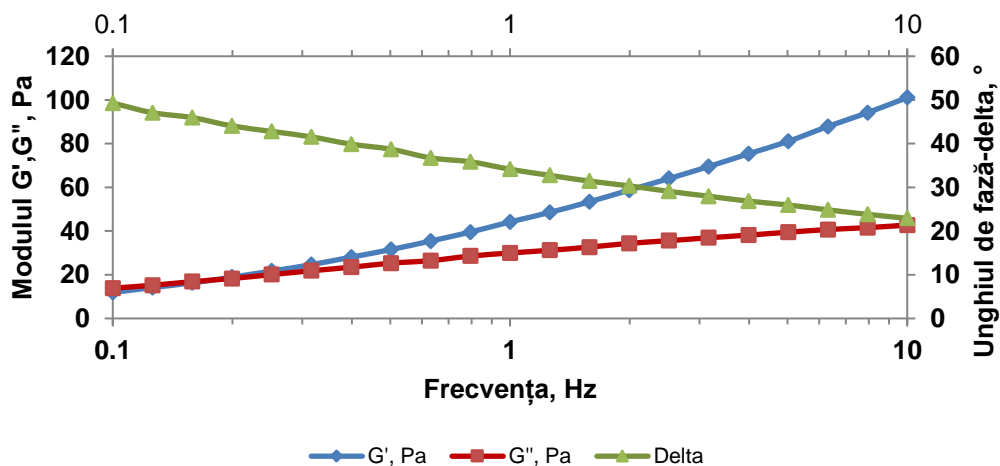


Figura 2.5. Variația parametrilor reologici (G' , G'' și delta) pentru probele de CMC. Testul de scanare a frecvenței gelului.

Delta, reprezentând unghiul de fază al oscilațiilor, a scăzut de la 49° la 23° . Având delimitarea vâscos/elastic în jurul valorii de 45° , putem observa și prin evoluția acestui parametru trecerea de la un comportament preponderent vâscos la unul preponderent elastic.

Putem marca cu aproximație frecvența de 0,2 Hz ca fiind punctul de inversie între G' și G'' . Rezultate similare au fost obținute și în cazul hidrogelurilor PVP-CMC în care modulul elastic G' înregistrează valori mult mai ridicate decât modulul vâscos G'' (Niladri et al., 2011).

În figura 2.6. este prezentat profilul reologic pentru gelul de Kappa-carrageenan (KC) care a evidențiat un caracter preponderent elastic pe tot parcursul testului de scanare a frecvenței cu componenta elastică G' mai mare decât componenta vâscoasă G'' .

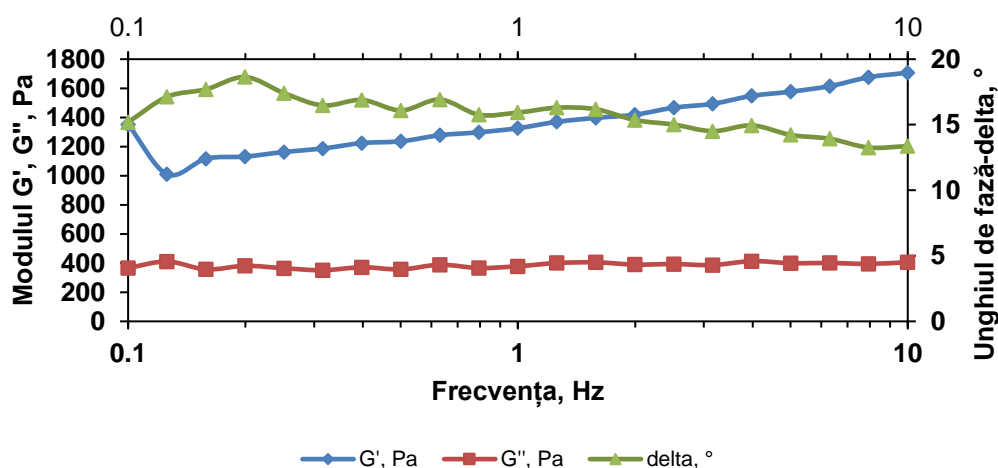


Figura 2.6. Variația parametrilor reologici (G' , G'' și delta) pentru probele de kappa-carrageenan. Testul de scanare a frecvenței gelului.

Diferența mare dintre valorile celor doi moduli confirmă faptul că, în cazul testului de scanare a frecvenței, gelul de KC se comportă ca un solid autentic. Gelurile adevărate se formează printr-un număr suficient de zone de joncțiune în soluțiile de KC în prezența de săruri suficiente (Brenner et al., 2013; Brenner et al., 2015).

Se poate remarca faptul că, la valori mici ale frecvenței de 0,13 Hz, modulul de vâscozitate G'' înregistrează o ușoară creștere a valorii, iar modulul elastic G' înregistrează o ușoară scădere a valorii, dar aceste modificări sunt mici și nu influențează semnificativ comportamentul probelor de carrageenan pe durata testului. Unghiul de fază al oscilațiilor, delta, a înregistrat o scădere pe toată lungimea intervalului analizat de la $15,19^\circ$ la $13,37^\circ$. Spre deosebire de acesta, componenta elastică G' crește odată cu creșterea frecvenței pe toată lungimea intervalului analizat de la valoarea de 1352 Pa la 1707 Pa. Componenta vâscoasă G'' marchează un parcurs liniar pe toată lungimea intervalului analizat, cu o ușoară creștere pe finalul domeniului, înregistrând valori de la 367 Pa la 405 Pa. Rezultate similare în ceea ce privește evoluția modurilor de vâscoelasticitate pentru gelurile de KC, cât și pentru gelurile de gumă Konjac (KG), au fost obținute și de He Xue et. al. (2012).

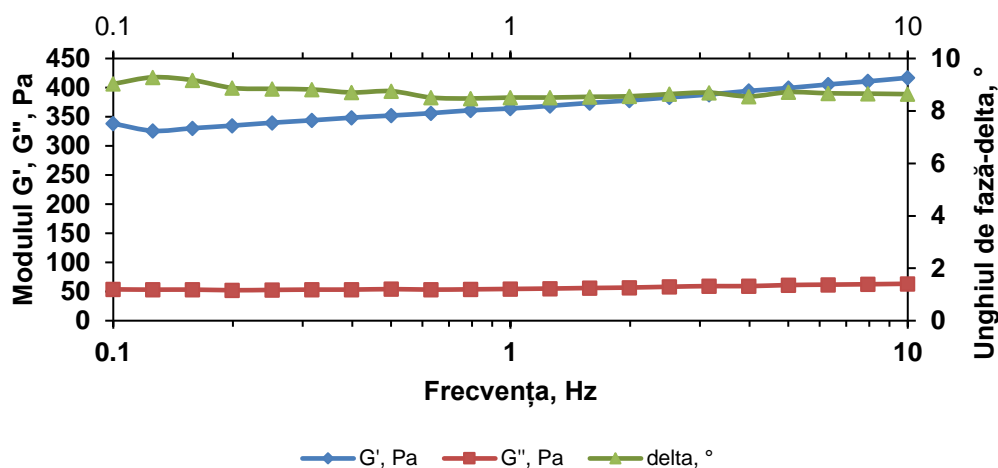


Figura 2.7. Variația parametrilor reologici (G' , G'' și δ) pentru probele de gumă Konjac. Testul de scanare al frecvenței.

În figura 2.7. poate fi observat comportamentul reologic al suspensiei de gumă Konjac (KG) ca urmare a scanării frecvenței oscilațiilor. Comportamentul gelului de KG a rămas asemănător cu cel al gelului de KC. Astfel, identificăm și pentru gelul de KG un caracter preponderent elastic, în care G' este mai mare decât G'' pe tot parcursul frecvenței (0,1-10 Hz).

Totodată, ambele module vâscoelastice înregistrează o creștere ușoară pe tot domeniul analizat, odată cu creșterea valorilor frecvenței. Cu ajutorul testului de scanare a deformării, în figurile 2.8., 2.9., 2.10. și 2.11., s-a analizat linearitatea materialului pentru gelurile de alginat, CMC, carrageenan și Konjac.

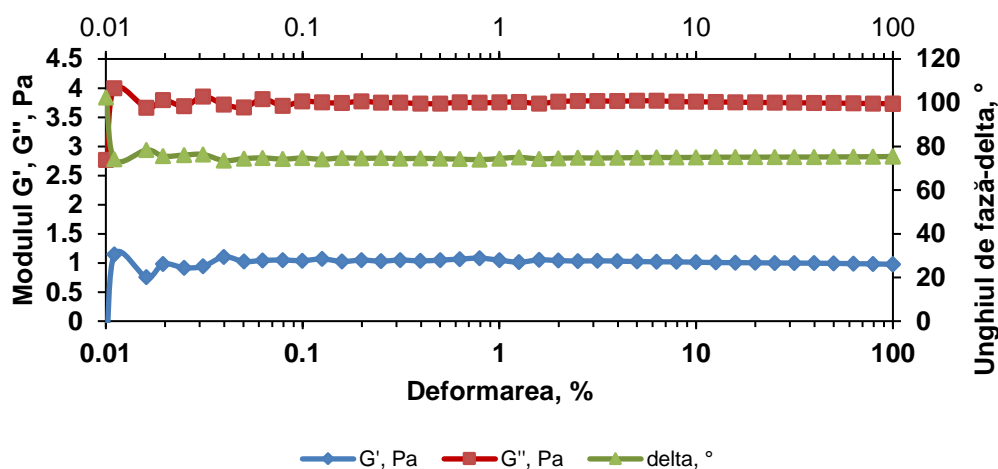


Figura 2.8. Variația parametrilor reologici (G' , G'' și δ) pentru probele de alginat. Testul de scanare a deformării pentru gelul de alginat.

Spre deosebire de gelul de CMC (figura 2.9.), unde a putut fi înregistrată limita domeniului de vâscoelasticitate, în cazul gelului de alginat valorile parametrilor de vâscoelasticitate au rămas constante pe toată durata testului, matricea rămânând stabilă chiar și la deformări de 100%. Totuși, spre deosebire de CMC, gelul de alginat a prezentat un caracter vâscos, cu valorile G'' marcând o medie de 3,75 Pa prevalând asupra valorilor lui G' cu o medie mai mică de 1 Pa, iar valorile unghiului δ fiind mult apropiate de cele ale unui fluid.

Rezultate similare pentru testul de scanare a deformării a probelor gelului de alginat au fost obținute și de Belalia et al. (2014) cu $G'' > G'$. Astfel, combinația dintre un polimer cu masă

moleculară mare și un surfactant formează un complex cu vâscozitate ridicată rezistent la deformări mari.

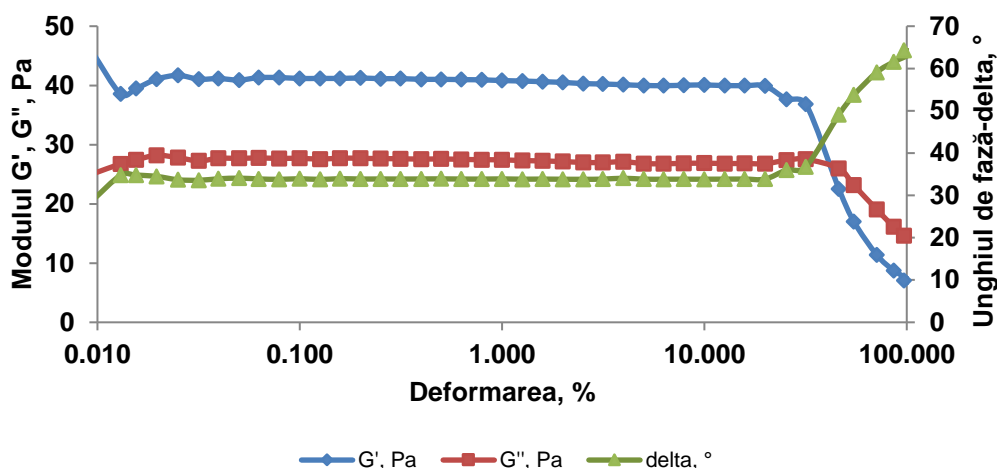


Figura 2.9. Variația parametrilor reologici (G' , G'' și δ) pentru probele de CMC. Testul de scanare a deformării pentru gelul de CMC.

În figura 2.9., pentru testul de scanare a deformării, se poate observa că până la o deformare de 25%, modulul elastic G' , modulul vâscos G'' și unghiul δ au rămas aproximativ constante ca evoluție, materialul comportându-se ca un solid cu $G' > G''$. După pragul de 25% al deformării s-a observat ieșirea din domeniul de vâscoelasticitate, fiind înregistrată și o schimbare a fazelor la o deformare de aproximativ 46%, când gelul a început să curgă, componenta vâscoasă predominând asupra componentei elastice. În urma testului de scanare a deformării s-a putut stabili deformarea critică a domeniului de vâscoelasticitate. Rezultate similare în ceea ce privește evoluția celor doi moduli au fost obținute și de (Stephen et al., 2016), unde la deformări mici valoarea modului de elasticitate G' este mai mare decât valoarea modului de vâscozitate G'' pentru diverse variante de CMC.

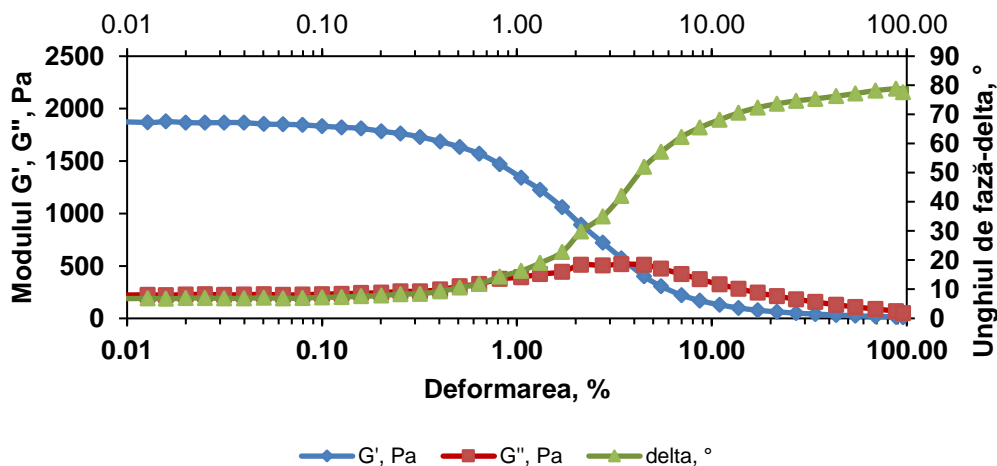


Figura 2.10. Variația parametrilor reologici (G' , G'' și δ) pentru probele de carrageenan. Testul de scanare a deformării pentru gelul de carrageenan.

Figura 2.10. ilustrează profilul reologic al probei de carrageenan. Gelul de carrageenan nu a prezentat o structură stabilă, domeniul de vâscoelasticitate putând fi înregistrat doar până la deformări de maximum 1%, după care, la amplitudini ale oscilațiilor de aproximativ 3,5% fazele s-au inversat, componenta vâscoasă prevalând asupra celei elastice. Astfel, materialul devine fluid. Tăria forțelor coloidale este indicată de $\tan \delta = (G''/G')$. O $\tan \delta$ cu valoare mai mică

de 1 sugerează faptul că particulele sunt puternic asociate datorită forțelor coloidale și astfel poate surveni sedimentarea. O valoare mai mare de 1 pentru $\tan \delta$ sugerează faptul că particulele sunt puternic dissociate. Deformările critice pentru sistemele stabilizate electrostatic sunt în jurul valorii de 0,01% până la 0,5%, iar pentru sistemele stabilizate steric între 1% și 5% ca în cazul de față. Rezultatele pentru proba de carrageenan sunt oarecum similare probei de CMC cu diferența că schimbarea fazelor apare mult mai repede pentru proba de carrageenan la o deformare de 3,44%, spre deosebire de proba de CMC unde schimbarea de fază apare la o deformare de 46%.

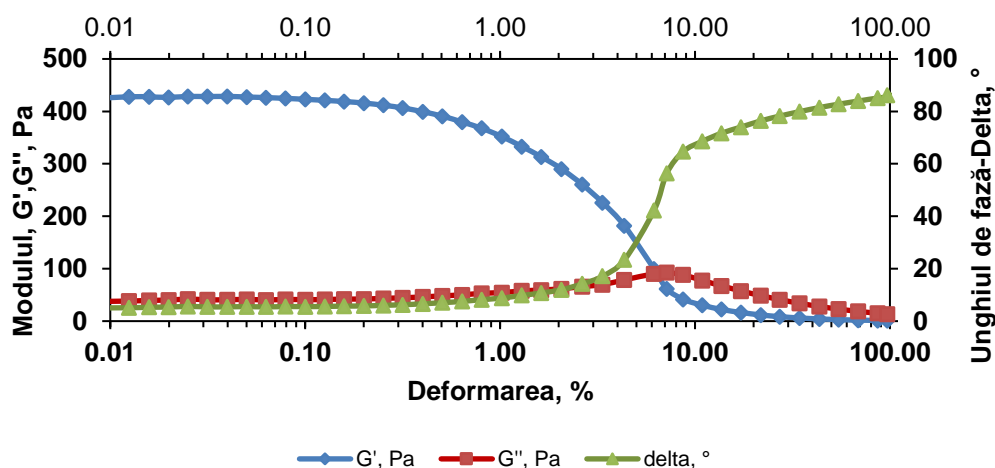


Figura 2.11. Variația parametrilor reologici (G' , G'' și delta) pentru probele de Konjac mannan. Testul de scanare a deformării pentru gelul de gumă Konjac.

În figura 2.11., comportamentul gelului de Konjac în timpul testului de scanare a amplitudinii oscilațiilor a fost relativ identic cu cel al gelului de carrageenan. Materialul a fost stabil până în jurul deformării de 1,5% după care a început să curgă. Rezultate similare au fost înregistrate și de (He Xue et al., 2012), care prin combinarea dintre Konjac glucomannan hidrolizat cu carrageenan a evidențiat o tărie sporită a gelului format. Și în acest caz, G' este mai mare decât G'' pe o suprafață semnificativă a domeniului de deformare.

c. Influența concentrației asupra vâscozității soluțiilor de hidrocoloizi

Evoluția vâscozității probelor de alginat și CMC a fost ilustrată în figura 2.12., 2.13. și se remarcă o creștere graduală, odată cu creșterea concentrației de hidrocoloid în soluție într-un anumit interval de timp. În cazul soluțiilor de alginat, vâscozitatea a crescut gradual de la valoarea de 27 cSt la o concentrație a soluției de 0,5%, până la o valoare a vâscozității de 208 cSt când soluția are concentrația maximă de 1,5%. Graficul indică o creștere liniară pe tot parcursul domeniului. În cazul soluțiilor de CMC, vâscozitatea a crescut de la valoarea de 10 cSt la o concentrație a soluției de 0,5% și a atins un maxim de 42 cSt la o concentrație maximă de 1,5%.

Probele de alginat analizate au înregistrat valori mult mai mari ale vâscozității spre deosebire de probele de CMC, atât la concentrații mici de 0,5%, cât și la concentrații maxime de 1,5%. În graficele 2.12 și 2.13, timpul (exprimat în secunde) indică o valoare mai mare pentru soluțiile de alginat decât pentru cele de CMC datorită vâscozității superioare a alginatului care a curs prin cupa vâscozimetriei într-un interval de timp mult mai mare.

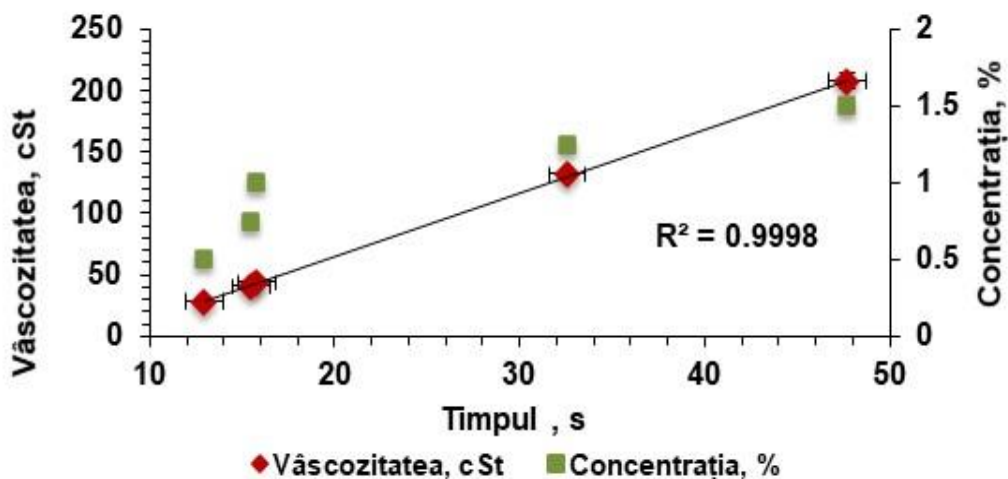


Figura 2.12. Evoluția vâscozității probelor de alginat în funcție de concentrație și timp.

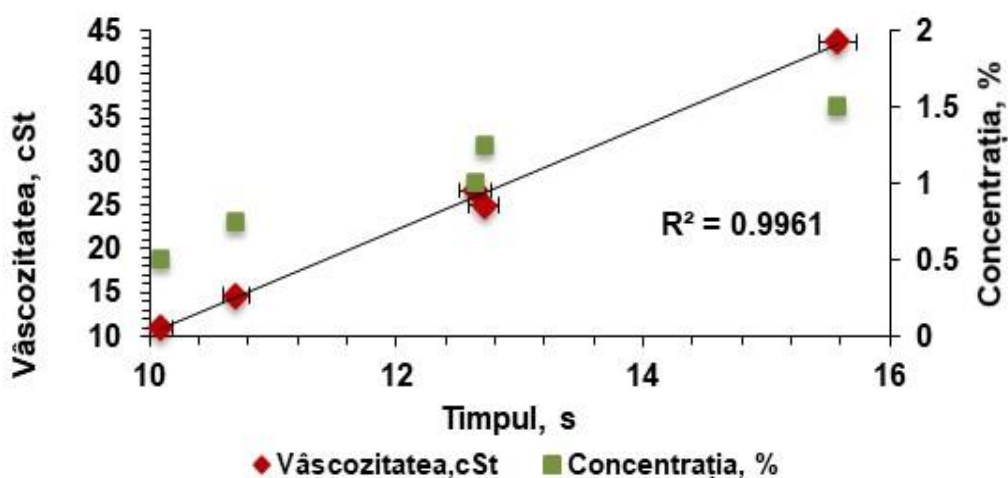


Figura 2.13. Evoluția vâscozității probelor de CMC în funcție de concentrație și timp.

Această proprietate a CMC se datorează structurii interne a polizaharidului, fapt evidențiat și în experimentele de vâscoelasticitate relatate anterior. Atât în figura 2.12., cât și în figura 2.13. analiza statistică indică valori ale probabilității de ordinul $p < 0,05$ pentru vâscozitățile celor doi hidrocoloizi validând astfel variațiile dintre și din interiorul grupurilor analizate. Probele de carrageenan și Konjac au fost ilustrate în figura 2.14., 2.15. și au indicat, de asemenea, creșteri graduale ale vâscozității, dar la valori diferite față de soluțiile de alginat și CMC.

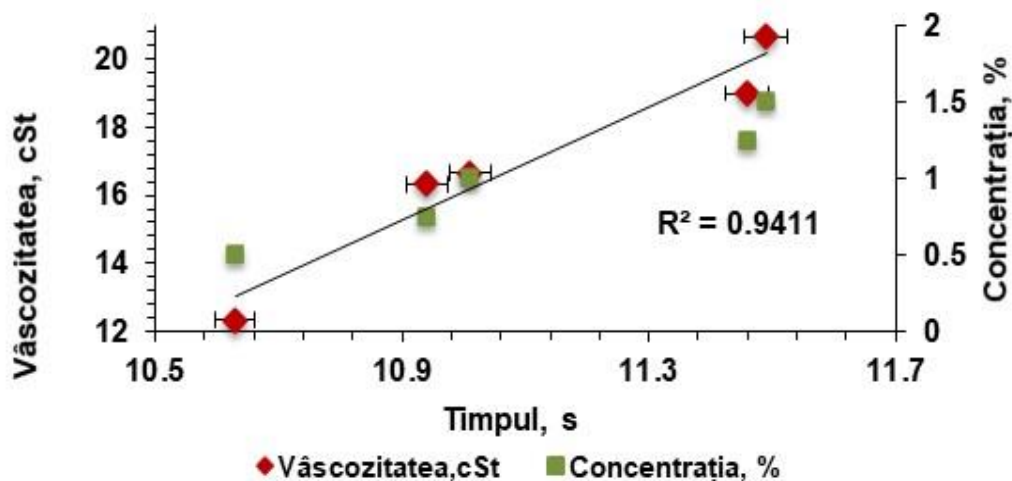


Figura 2.14. Evoluția vâscozității probelor de carrageenan în funcție de concentrație și timp.

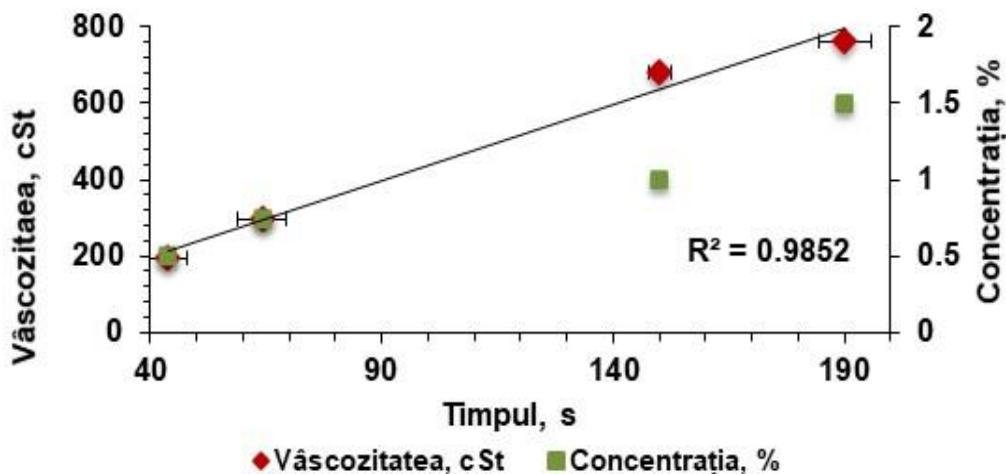


Figura 2.15. Evoluția vâscozității probelor de Konjac în funcție de concentrație și timp.

Astfel, vâscozitatea soluțiilor de carrageenan a crescut de la valoarea de 12 cSt și o concentrație de 0,5%, până la o valoare de 18 cSt și o concentrație a soluției de 1,5%. În cazul soluțiilor de Konjac s-a întâlnit o creștere neașteptată a vâscozității și anume, de la o valoare de 190 cSt și o concentrație de 0,5% ajungând la o valoare de 682 cSt și o concentrație de doar 1,0%, determinările vâscozității soluțiilor de Konjac la concentrații mai mari de 1,5% fiind practic imposibile datorită caracterului foarte vâscos al materialului analizat. A putut fi remarcat faptul că soluțiile de Konjac au fost foarte vâscoase la concentrații mici spre deosebire de soluțiile de carrageenan. Un alt indicator al acestei vâscozități superioare a Konjac-ului a fost timpul în care soluția a reușit a curge din cupa vâscozometrică, atingând o valoare de 150 s la o concentrație a soluției de 1,0% și o valoare maximă a vâscozității. O creștere a vâscozității în timp (ore și zile) pentru probe din făină de Konjac și gumă Konjac au fost raportate de (W. Xu et al., 2014), dar la care concentrația probelor a fost limitată la maxim 1%.

Drept clasificare orientativă, a putut fi remarcat faptul că soluțiile de Konjac și alginat au fost cele mai vâscoase atât la concentrații mici de 0,5%, cât și la concentrații mai ridicate de 1,5%. Aceste două materiale au fost urmate în ordinea vâscozității de soluțiile de CMC și respectiv carrageenan a căror valori obținute sunt mult mai mici. În ambele figuri 2.14. și 2.15., $p < 0,05$ pentru valorile vâscozității carrageenanului și gumei Konjac.

2.4. Concluzii parțiale

- Curbele de curgere ale probelor P1 și P2 (alginat și CMC) au indicat valori specifice pentru cei doi hidrocoloizi. În cazul gelului de CMC viteza de forfecare a fost invers proporțională cu vâscozitatea, adică cu cât a crescut forfecarea, cu atât a scăzut vâscozitatea gelului, spre deosebire de gelul de alginat care la viteze mici de forfecare a manifestat o creștere a vâscozității, iar la viteze mari de forfecare a manifestat o scădere a acesteia.
- În cazul testului de scanare a frecvenței, gelul de CMC a înregistrat la amplitudini mici ale oscilațiilor un comportament predominant vâscos $G'' > G'$, iar la amplitudini ale oscilațiilor peste valori de 0,2 Hz s-a înregistrat $G' > G''$ indicând astfel un caracter preponderent elastic al gelului. În cazul gelului de alginat, pe tot parcursul testului $G'' > G'$, marcând astfel un caracter preponderent vâscos. La gelurile de carrageenan și Konjac a fost înregistrat un comportament similar, în care pe tot parcursul testului $G' > G''$, marcând probe cu un caracter elastic.
- În cazul testului de scanare a deformării au fost notate următoarele concluzii: pentru gelul de CMC la deformări $< 25\%$, componentele G' , G'' și delta au fost constante ca evoluție. La deformări $> 25\%$ gelul de CMC a început să curgă, astfel la deformare de 46%, $G'' > G'$. În cazul gelului de alginat pe tot parcursul testului, gelul a avut un comportament de fluid (a curs) și $G'' > G'$. La gelurile de carrageenan și Konjac au fost înregistrate comportamente similare. Astfel, până la deformări de 3,5%, $G' > G''$ (comportament de solid), iar la deformări de peste 3,5% , $G'' > G'$ (comportament de fluid).
- Datele obținute prin raportarea vâscozității la concentrația soluției și timp pentru alginat și CMC au indicat o valoare mult mai mare a vâscozității pentru soluțiile de alginat spre deosebire de soluțiile de CMC pe tot domeniul de variație a concentrației pentru cei doi hidrocoloizi.
- În cazul vâscozității soluțiilor de carrageenan și Konjac situația a fost inversă față de vâscozitatea soluțiilor de alginat și CMC. Vâscozitatea soluțiilor de Konjac a fost mai mare decât cea a soluțiilor de carrageenan chiar și la concentrații foarte mici ale gumei Konjac. Acest lucru a fost posibil datorită structurii gumei Konjac manan care a avut o orientare spațială favorabilă adității moleculelor de apă și, implicit, formării unei vâscozități ridicate chiar și la concentrații foarte mici ale soluției.
- Analiza individuală a probelor P1-P4 poate indica anumite corelații și sinergii între acestea. În cazul probelor de Konjac și CMC a predominat caracterul vâscos spre deosebire de probele de alginat și carrageenan la care a predominat, în general, caracterul elastic. Tocmai echilibrul între cele două perechi de hidrocoloizi poate fi esențial pentru obținerea unor filme de calitate.

III. Studiul filmelor funcționale bioedibile pe bază de alginat de sodiu

3.1. Introducere

Acest capitol include studiul referitor la obținerea filmelor și înglobarea de ingrediente bioactive (preparatul fermentat pe bază de ceapă, extractul de drojdie și o tulpină probiotică de *B. subtilis* CU1) în vederea îmbunătățirii proprietăților filmului și, totodată, în vederea îmbunătățirii caracteristicilor produsului finit. Studiul constă în analize de culoare și grosime a filmului, analiza permeabilității vaporilor de apă, analiza Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDX) și Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) pentru a studia morfologia internă a membranei obținute.

3.2. Materiale, metode de analiză și aparatura utilizată în experimentări

În experimentări s-au folosit următoarele materiale cu codificările aferente: [CMC] – sodium carboximetil-celuloza, denumire comercială produs: 7H9, producător Ashland, SUA; [AL] – Alginat de sodiu, denumire comercială produs: Ferwo Alginate F400, producător Caldic Ingredients, Rotterdam, Olanda; [RC] – Carrageenan Rafinat, denumire comercială produs: BLK 1120, producător BLG-Brilliant Gum, Shanghai, China; [KG] – Konjac mannan, denumire comercială produs: MRA, producător Food Ingredients & Solutions, Olanda; *Bacillus subtilis* CU1, denumire comercială Probasis *B. subtilis* CU1, producător LeSaffre Human Care, Franța și înregistrat cu nr. CNCM I-2745; Mediul de cultură selectat Luria Bertani Agar, Miller, producător Compania Titan Biotech Ltd., Rajasthan, India; [ED] – Extract de drojdie, denumire comercială Springer 4101/0, producător Compania BioSpringer, Maison Allfort, Franța; [PFC] – Preparat fermentat pe bază de ceapă, denumire comercială SLR 100, producător Compania Fi&S, Olanda; Glicerol și Acid Oleic – utilizați ca plasticizanți, producător Sigma Aldrich, Germania; CaCl₂ folosită ca agent de reticulare a fost furnizată de Compania Sigma Aldrich; 2,2'-Difenil-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) comercializat de Sigma Chemicals Co.

Investigațiile au urmărit:

- Analiza reologică a filmelor pe bază de alginat de sodiu
- Determinarea capacității antioxidante a ingredientelor bioactive ce intră în compoziția filmului
- Analiza microbiologică a filmelor pe bază de alginat de sodiu
- Permeabilitatea filmelor pe bază de alginat de sodiu
- Analiza EDS și SEM
- Analiza FTIR
- Proiectarea experimentală

3.2.2. Metode de analiză și aparatura utilizată în experimentări

3.2.2.1. Reologia filmelor pe bază de alginat

Caracterizarea reologică a gelurilor și filmelor pe bază de alginat a fost realizată cu ajutorul Reometrului AR 2000EX de la TA Instruments utilizând o placă cu geometrie conică, cu un unghi conic de 1° și diametru de 50 mm. În tabelul 3.1. este ilustrată baza amestecului de hidrocoloizi.

Tabelul 3.1. Amestecul de hidrocoloizi folosit pentru obținerea bazei filmelor bioedibile.

| Nr. | Hidrocoloid UM | P1 g | P2 g | P3 g | P4 g | P5 g | P6 g | P7 g |
|-----|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Amestec film | AL | AL+RC | AL+KG | AL+CMC | AL+RC+KG | AL+RC+CMC | AL+KG+CMC |
| 1 | Alginat | 6 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 2 | Carrageenan | - | 1 | - | - | 0.5 | 0.5 | - |
| 3 | Konjac Gumă | - | - | 1 | - | 0.5 | - | 0.5 |
| 4 | CMC | - | - | - | 1 | - | 0.5 | 0.5 |
| 5 | Apă distilată | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 |
| 6 | Total | 406 | 406 | 406 | 406 | 406 | 406 | 406 |

3.2.2.3. Analiza microbiologică a filmelor pe bază de alginat**a. Viabilitatea tulpinii de *Bacillus subtilis* CU1 în mixul de ingrediente bioactive**

Experimentul a pornit de la premiza că tulpina pură analizată de *Bacillus subtilis* CU1 conține conform fișei tehnice și certificatului de analiză o concentrație de microorganisme $>10^{11}$ ufc/g (spori viabili). În tabelul 3.2. este ilustrat sistemul de preparare al ingredientelor bioactive pentru 100 ml soluție.

Tabelul 3.2. Sistemul de preparare al ingredientelor bioactive (cantități pentru 100 ml soluție)

| Proba | <i>B. subtilis</i> CU1 (g) | ED(g) | PFC(g) |
|-------|----------------------------|-------|--------|
| M | 0,25g | - | - |
| P1 | 0,25g | 1,0g | - |
| P2 | 0,25g | - | 1,0g |
| P3 | 0,25g | 1,0g | 1,0g |

b. Viabilitatea tulpinii de *Bacillus subtilis* CU1 în filme pe bază de alginat cu ingrediente bioactive încorporate

Rețetele pentru filmele pe bază de alginat de sodiu cu elemente active au fost ilustrate în tabelul 3.3. Amestecul de hidrocoloizi utilizat a fost ales în funcție de compatibilitatea reologică și rezistența la rupere a filmelor pe bază de alginat analizate în subcapitolul anterior.

Tabelul 3.3. Mixul de ingrediente bioactive al filmelor pe bază de alginat pentru 100 ml soluție

| Formula film nr. 1 | <i>B.subtilis</i> CU1 (g) | ED (g) | PFC (g) |
|--------------------|---------------------------|--------|---------|
| 1A: AL + KG + CMC | 0.500g | 0.500g | 0.500g |
| 1B: AL + KG + CMC | 0.625g | 1.000g | 1.000g |
| 1C: AL + KG + CMC | 0.750g | 1.500g | 1.500g |
| Formula film nr. 2 | | | |
| 2A:AL+ KG+ CMC+ RC | 0.500g | 0.500g | 0.500g |
| 2B:AL+ KG+ CMC+ RC | 0.625g | 1.000g | 1.000g |
| 2C:AL+ KG+ CMC+ RC | 0.750g | 1.500g | 1.500g |

Experimentul a avut ca bază formulele de mai jos:

$$\text{AL [1,125g] + KG [0,1875g] + CMC [0,1875g] = 1,5g} \quad (3.2)$$

$$\text{AL [1,0275g] + KG [0,1575g] + CMC [0,1575g] + RC [0,1575g] = 1,5g} \quad (3.3)$$

3.2.2.6. Permeabilitatea filmelor pe bază de alginat

Permeabilitatea filmelor pe bază de alginat de sodiu a fost determinată gravimetric după standardul ASTM E96-93. Tabelul 3.6. prezintă modul de lucru pentru determinarea WVTR și a WVP pentru proba martor (M) și pentru proba (P1) care suferă diverse variații descrise de codul probei: a, b, c și d. Diferențele se referă la temperatura mediului ambiant la care sunt lăsate probele timp de 24 ore și la umiditatea relativă din interiorul și exteriorul probelor analizate. Două metode descriu această analiză: "Metoda cu sicativ,, transportul vaporilor de apă este realizat din mediul extern în interiorul cupei și "Metoda cu apă distilată", vaporii de apă se transmit din interior la exterior, interiorul fiind în acest caz plin cu apă distilată.

Tabelul 3.6. Parametrii probelor M și P1 pentru măsurarea permeabilității vaporilor de apă a filmelor bioedibile (adaptat după ASTM E96).

| Metoda folosită | Proba | Cod probă | Temperatura, °C | RH%, pahar g mm/kPa zi m ² | RH%, exterior g mm/kPa zi m ² |
|-------------------|-------|-----------|-----------------|---------------------------------------|--|
| Metoda cu sicativ | M | a | 8 | 0 | 55% |
| Metoda cu sicativ | M | b | 22 | 0 | 50% |
| Metoda cu apă D | M | c | 8 | 100 | 55% |
| Metoda cu apă D | M | d | 22 | 100 | 50% |
| Metoda cu sicativ | P1 | a | 8 | 0 | 55% |
| Metoda cu sicativ | P1 | b | 22 | 0 | 50% |
| Metoda cu apă D | P1 | c | 8 | 100 | 55% |
| Metoda cu apă D | P1 | d | 22 | 100 | 50% |

Determinarea permeabilității și a ratei de transmitere a vaporilor de apă s-a efectuat astfel:

Tabelul 3.7. Cantitățile de plasticizant (glicerol și/sau acid oleic) adăugate în rețeta filmelor pe bază de alginat de sodiu.

| Proba | Glicerol, (g) | Acid Oleic, (g) |
|--------|---------------|-----------------|
| Martor | 0 | 0 |
| P1 | 0,675 | 0 |
| P2 | 0,900 | 0 |
| P3 | 1,125 | 0 |
| P4 | 0,675 | 0,675 |
| P5 | 0,900 | 0,900 |
| P6 | 1,125 | 1,125 |

3.3. Rezultate și discuții

3.3.1. Reologia filmelor pe bază de alginat de sodiu

În figura 3.3. este reprezentată rezistența mecanică a șapte filme (P1-P7) pentru a putea fi determinată care dintre variantele propuse prezintă o rezistență sporită și poate reprezenta ulterior o bază pentru matricea componentelor active. Toate probele analizate au avut la bază alginatul de sodiu drept hidrocoloid principal. Profilele reologice ale probelor (AL+CMC) și (AL+KG+CMC) au pus în evidență caracteristicile liniare și uniforme ale unui film optim din punct de vedere al rezistenței mecanice. În acest caz modulul elastic G' a fost limitat în intervalul $4-5 \times 10^6$ Pa și a fost stabil pe toată lungimea domeniului de analiză.

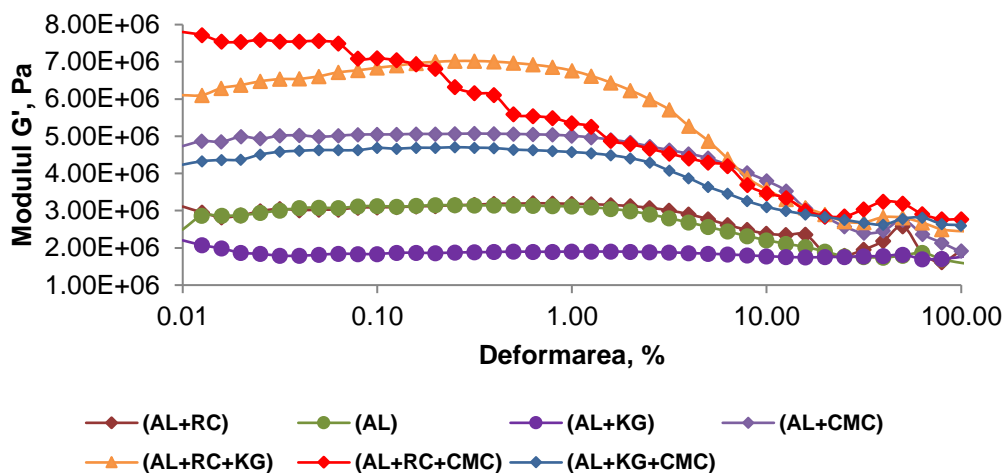


Figura 3.3. Rezistența mecanică și integritatea structurală a modului G' în filmele pe bază de alginat de sodiu.

Probele (AL+RC+KG) și (AL+RC+CMC) au prezentat un comportament elastic mai evident, datorită valorilor ridicate ale modului G' la amplitudini mici ale oscilațiilor decât probele anterior analizate. Acest lucru se poate datora unei structuri mai puternice a amestecului de hidrocoloizi, cu un comportament specific de solid, dar care nu este stabil pe toată lungimea domeniului de analiză. Tocmai această instabilitate a mixului de hidrocoloizi nu recomandă cele două probe pentru o rezistență mecanică sporită. În cazul probelor (AL), (AL+KG) și (AL+RC) rezistența mecanică înregistrată a prezentat valori mult mai mici decât în cazul primelor două probe analizate. În figura 3.4. a fost ilustrat modulul G'' (plastic) al filmelor pe bază de alginat de sodiu.

De regulă această caracteristică este corelată cu modulul G' (elastic) ce caracterizează filmul. În acest caz a fost înregistrată o creștere semnificativă a modului G'' în momentul în care deformarea a atins valoarea de 50% pentru probele (AL+RC), (AL+RC+CMC) și respectiv (AL+CMC). La polul opus, probele ce au înregistrat o anumită constanță pe tot parcursul de deformare au fost reprezentate de (AL), (AL+KG+CMC) și respectiv (AL+RC+KG).

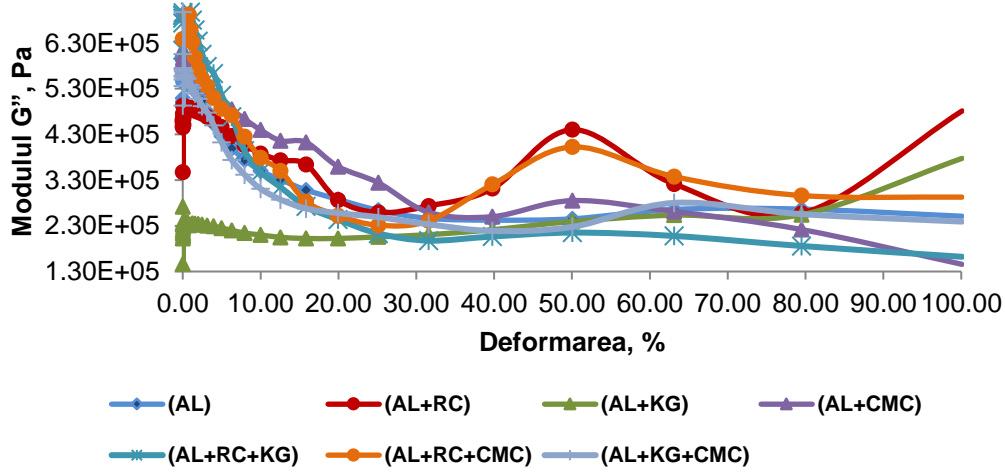


Figura 3.4. Rezistența mecanică și integritatea structurală a modului G'' în filmele pe bază de alginat de sodiu.

Atât în figura 3.3., cât și în figura 3.4. s-au evidențiat probele P3 și P7 datorită ambelor module de vâscoelasticitate (G' și G'') care au indicat un comportament liniar și relativ constant pe tot domeniul de analiză. Acest lucru a fost evidențiat și prin prisma rezistenței mecanice a celor două probe, notată în tabelul 3.10.

Tabelul 3.10. Rezistența mecanică a filmelor pe bază de alginat.

| Nr. Crt. | Proba | Amestec hidrocoloizi | ph gel | Punct rupere film, (MPa) |
|----------|-------|----------------------|-----------|--------------------------|
| 1 | P1 | AL | 7,25±0,03 | 50,09±0,01 |
| 2 | P2 | AL+RC | 6,91±0,06 | 28,39±3,26 |
| 3 | P3 | AL+KG | 7,1±0,01 | Nu se rupe |
| 4 | P4 | AL+CMC | 7,49±0,01 | 39,82±0,02 |
| 5 | P5 | AL+RC+KG | 7,46±0,07 | 31,62±0,01 |
| 6 | P6 | AL+RC+CMC | 7,25±0,02 | 22,40±2,72 |
| 7 | P7 | AL+KG+CMC | 7,58±0,09 | Nu se rupe |

Toate valorile reprezintă medii±deviația standard cu, n=3 și (p<0,05).

Pentru proba P1 cu alginat de sodiu, punctul de rupere a filmului a marcat valoarea de 50 MPa înregistrând astfel cea mai mare valoare comparativ cu celelalte probe analizate. Totuși, în cazul probelor P3 (AL+KG) și P7 (AL+KG+CMC) datorită caracteristicilor superioare de elasticitate pe care aceste filme le posedă, acestea nu s-au rupt pe parcursul testului de rezistență mecanică. Proba P7 a reprezentat amestecul ideal între hidrocoloizii alginat de sodiu, gumă Konjac și carboximetil-celuloză pentru o matrice suport în care pot fi încorporate elemente bioactive. Probele analizate au prezentat valori ale rezistenței la rupere între 22,5 MPa și 50 MPa, valori similare cu cele obținute de [Silva et al. \(2009\)](#), în filme pe bază de pectină și alginat.

Determinările reologice individuale ale gelurilor de AL, CMC, RC și KG din figura 3.5. au indicat rezultate promițătoare ale modulului elastic pentru (AL) și (CMC) reprezentând componente stabile a căror linearitate a fost constantă pe tot domeniul de deformare. În cazul probelor (RC) și (KG), deși rezistența mecanică a fost superioară probelor anterioare, aceasta nu s-a menținut stabilă decât până la valoarea de 1%, după care a început să piardă semnificativ din valoare.

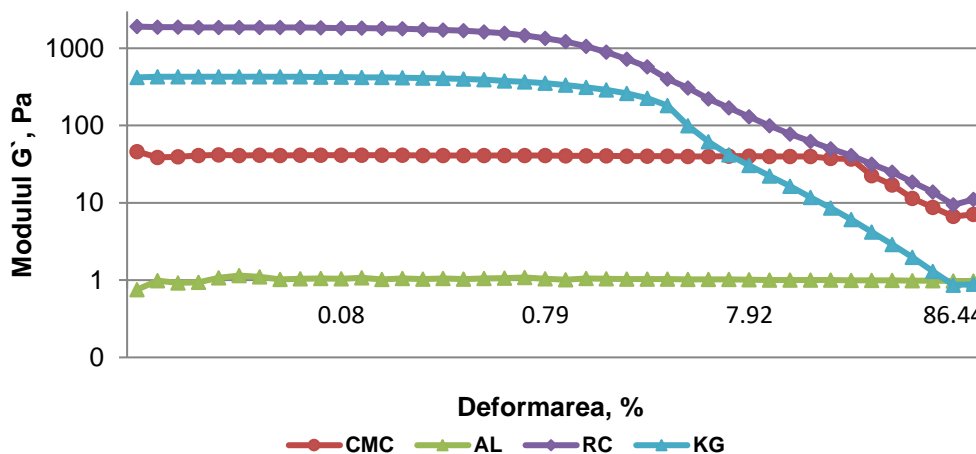


Figura 3.5. Variația modulului de elasticitate, G' pentru gelurile de CMC, AL, RC și KG în raport cu deformarea materialului. Testul de scanare a deformării.

În figura 3.6. modulul de vâscozitate, G'' a înregistrat valori liniare pe tot domeniul de deformare pentru probele (AL) și (CMC). Tocmai linearitatea celor două probe sugerează o posibilă sinergie a acestora și utilizarea lor la fabricarea filmelor funcționale bioedibile. În cazul probelor (RC) și (KG), modulul G'' a indicat o creștere a vâscozității la valoarea de 511 Pa la o deformare de 3,97% pentru carrageenan și respectiv o valoare a vâscozității de 93 Pa la o deformare de 6,3% pentru guma Konjac. Ambele materiale au fost vâscoase, dar linearitatea

acestora pe domeniul de deformare a variat. Totuși, astfel de materiale pot fi utilizate în doze mici pentru obținerea filmelor bioedibile.

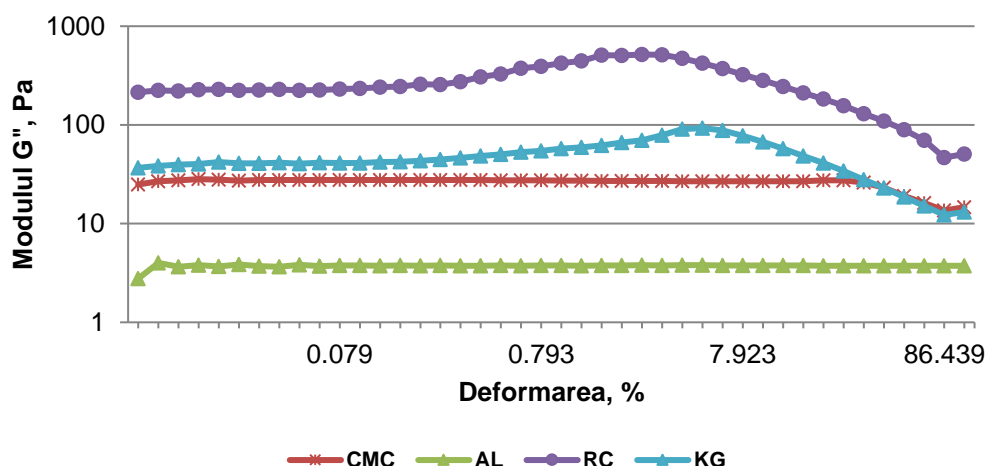


Figura 3.6. Variația modului de vâscozitate, G'' pentru gelurile de CMC, AL, RC și KG în raport cu deformarea materialului. Testul de scanare a deformării.

3.3.2. Capacitatea antioxidantă a ingredientelor bioactive

Capacitatea antioxidantă a extractului de drojdie și a preparatului fermentat pe bază de ceapă a fost determinată printr-o metodă distinctă, cantitativă, bazată pe activitatea DPPH. Conform rezultatelor prezentate în tabelul 3.11., activitatea antioxidantă a extractului de drojdie a avut o valoare semnificativă de 33,33% în comparație cu cea a preparatului fermentat pe bază de ceapă care a avut o valoare de doar 21,85%.

Tabelul 3.11. Capacitatea antioxidantă pentru extractul de drojdie și preparatul fermentat pe bază de ceapă

| Ingredient | Capacitate antioxidantă, DPPH-RSA (%) | DPPH, EC_{50} (mg/ml) |
|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| Extract de drojdie | 33,33±0,25 | 0,88±0,21 |
| Preparat fermentat pe bază de ceapă | 21,85±0,15 | 0,60±0,13 |

Toate valorile reprezintă medii±deviația standard cu $n=3$ și ($p<0,05$).

Aceste două ingrediente active pot fi introduse în matricea filmului pe bază de alginat de sodiu pentru efectul antioxidant și conservant al acestora și pot oferi un efect sinergic de protecție a produsului împotriva acțiunii pro-oxidative a unor factori externi și interni. Valoarea EC_{50} pentru cele două extracte a fost de 0,88 mg/ml și respectiv de 0,60 mg/ml ceea ce a indicat valori acceptabile pentru aceste două ingrediente. Rezultate similare au fost înregistrate și de [Santas et al., 2008](#); [Huang et al., 2009](#) și [Singh et al., 2009](#).

3.3.3. Analiza microbiologică a filmelor pe bază de alginat de sodiu

În figura 3.8. poate fi observată interacțiunea și influența elementelor active din extractul de drojdie și preparatului fermentat pe bază de ceapă asupra viabilității tulpinii de *Bacillus subtilis* CU1. În cazul probei martor (M), placa Petri a fost inoculată doar cu *Bacillus subtilis* CU1, iar viabilitatea celulelor pentru mai mult de 7 zile a ajuns în acest caz la un număr de

$7,2 \times 10^8$ ufc/g care poate reprezenta un număr considerabil, dacă se ține cont de faptul că nu au existat alte interacțiuni cu ingrediente conexe.

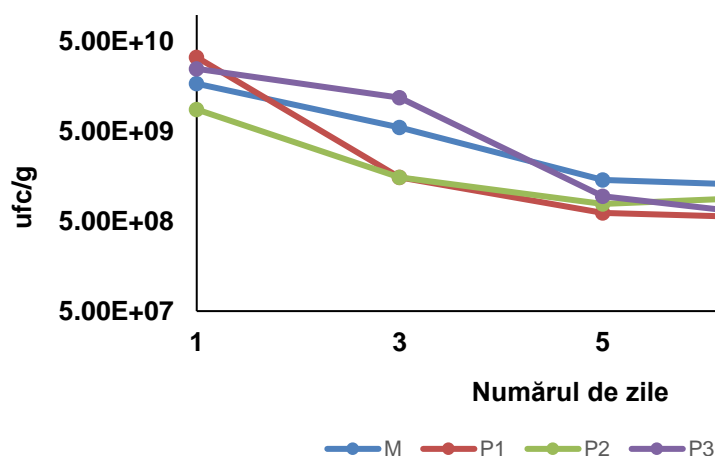


Figura 3.8. Influența elementelor active din preparatul fermentat pe bază de ceapă și extractul de drojdie asupra viabilității tulpinii probiotice de *Bacillus subtilis* CU1 timp de 8 zile la 4°C.

În cazul probei P1, care a conținut un amestec de *Bacillus subtilis* CU1 și produs fermentat pe bază de ceapă, au fost obținute valori scăzute în sensul în care s-a obținut o concentrație de doar $9,85 \times 10^7$ ufc/g. Acest lucru poate fi explicat datorită utilizării preparatului fermentat pe bază de ceapă adăugat care poate fi caracterizat ca fiind unul dintre cei mai buni agenți antimicrobieni de origine vegetală, cu acțiune similară usturoiului. Preparatul fermentat pe bază de ceapă poate ajuta la inhibarea și dezvoltarea tulpinii de *Bacillus subtilis* CU1 și a multor altor microorganisme datorită bacteriocinelor pe care acesta le conține și care atacă membrana celulară a bacteriilor. Aceste bacteriocine secționază membrana prin crearea la nivelul acesteia a unor pori care duc la creșterea permeabilității unor compuși minusculi cauzând astfel un eflux rapid de ioni pre-acumulați, aminoacizi și în unele cazuri a unor molecule de adenzin 5-trifosfat (ATP). O reacție majoră are loc atunci când se folosește preparatul fermentat pe bază de ceapă prin apariția de tiopropanal-S-oxid. Produsul fermentat pe bază de ceapă conține totodată compuși fenolici antimicrobieni, acid protocatehnic și catechol (Montville et al., 2012; Ray et al., 2013).

Pentru proba P2 unde s-a lucrat cu un amestec de *Bacillus subtilis* CU1 și extract de drojdie au fost obținute rezultate superioare în ceea ce privește valoarea ufc/g față de proba P1.

Aici valoarea maximă a atins numărul de $4,15 \times 10^8$ ufc/g, cauza fiind extractul de drojdie care a potențat dezvoltarea tulpinii de *Bacillus subtilis* CU1 datorită cantității ridicate de azot necesar pentru metabolismul microbial. Rezultatele obținute au fost posibile și datorită unei relații de simbioză între cele două ingrediente bioactive; astfel, extractul de drojdie, datorită conținutului mare de vitamine din grupul B, reprezintă un factor de creștere pentru bacterii care, la rândul lor, produc acid lactic creând un pH optim pentru drojdi. Extractul de drojdie conține minim 55% proteină în compoziție și este bogat în glutatoin. Glutatoinul este capabil să prevină degradarea unor importante componente celulare cauzate de specii reactive la oxigen precum: radicali liberi, peroxid, peroxid lipidic și metale grele (Pompella et al., 2015).

În cazul probei P3 s-a utilizat un amestec de *Bacillus subtilis* CU1, extract de drojdie și produsul fermentat pe bază de ceapă și a fost înregistrat un rezultat optim în ceea ce privește creșterea populației microbiene. Acesta prezintă un punct intermediar unde preparatul fermentat pe bază de ceapă și extractul de drojdie acționează sinergic și potențează dezvoltarea tulpinii de *Bacillus subtilis* CU1 ajungându-se la o valoare de $3,75 \times 10^8$ ufc/g.

Multiplicarea celulară a tulpinii de *Bacillus subtilis* CU1 în filmele pe bază de alginat de sodiu cu elemente active încorporate a fost ilustrată în figura 3.9.

Pentru formula (1), alginatul de sodiu, guma konjac și carboximetilceluloza au fost utilizate ca materiale de bază la obținerea filmului bioedibil. În cazul probei 1A, au fost obținute valorile cele mai mici dintre toate cele șase determinări, ajungându-se la numărul de $8,3 \times 10^8$ ufc/g după 8 zile. Acest rezultat poate fi pus pe seama faptului că proba 1A, produsul fermentat pe bază de ceapă și extract de drojdie a fost inoculată cu cea mai mică cantitate de *Bacillus subtilis* CU1.

În cazul probelor 1B și 1C, rezultatele obținute au fost cu o unitate logaritmică îmbunătățite în ceea ce privește numărul de ufc/g, cu valori atinse de $1,1 \times 10^9$ ufc/g și respectiv $1,3 \times 10^9$ ufc/g. Aceste rezultate similare au prezentat valori mult peste cele de la proba 1A, datorită dublării cantităților de elemente active încorporate în matricea filmului pentru proba 1B și a triplării cantităților de elemente active pentru proba 1C.

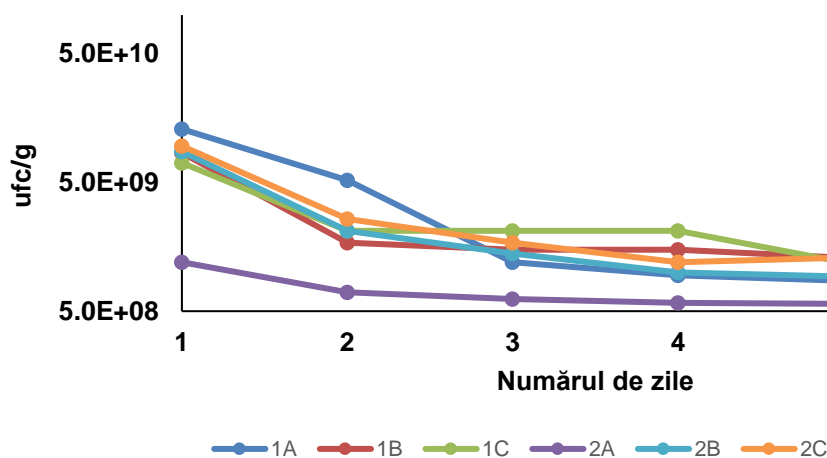


Figura 3.9. Multiplicarea lui *Bacillus subtilis* CU1 în filmele bioedibile pe bază de alginat de sodiu cu elemente active încorporate.

În cazul probei 1C, deși cantitatea de ingrediente bioactive a fost cu 50% mai mare decât pentru proba 1B, rezultatele obținute au fost aproximativ similare. Astfel, reducerea logaritmică a fost direct proporțională cu creșterea concentrației de acid galic, ceea ce relevă activitatea antimicrobiană ridicată a preparatului fermentat pe bază de ceapă. Pentru formula (2), au fost utilizați alginatul de sodiu, carboximetilceluloza, guma konjac și carrageenanul rafinat pentru obținerea matricei suport. În cazul probelor 2A și 2B s-au obținut valori apropiate, de $1,3 \times 10^9$ ufc/g și respectiv $1,4 \times 10^9$ ufc/g după 8 zile, ceea ce reprezintă valori similare cu cele obținute în cazul filmelor stabilizate la formula (1). În cazul probei 2C s-au obținut valori de $1,8 \times 10^9$ ufc/g de *Bacillus subtilis* CU1, valori normale luând în considerare faptul că această variantă a fost inoculată cu cantitatea cea mai mare de microorganism și ingrediente bioactive. În cazul ambelor rețete propuse, valorile cele mai bune au fost obținute în cazul probelor 1C și respectiv 2C, adică în cazul dozajelor maxime de elemente active.

În imaginile reprezentate ca secțiune a filmului bioedibil captat cu tehnologia SEM au putut fi observate diferite straturi de polimeri care au încorporat componentele bioactive (fig. 3.10).

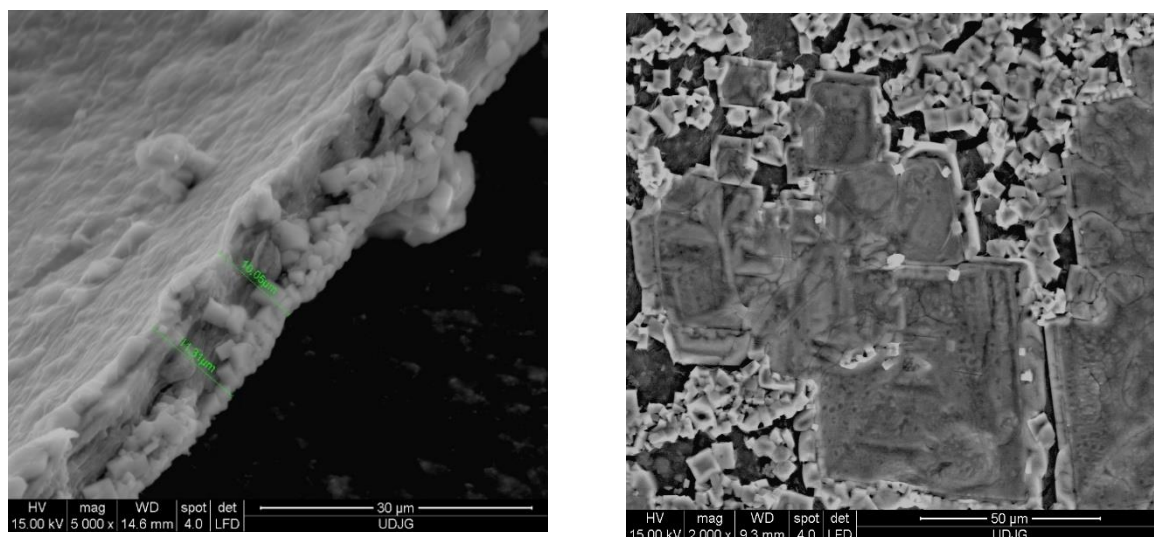


Figura 3.10. Imagini în secțiune a filmelor bioedibile și reprezentarea structurii coloniilor de *Bacillus subtilis* CU1 la SEM.

Suprafața filmului a fost neregulată și aspră ca aspect, prezentând riduri, cu o structură uniformă, compactă și densă. Din interacțiunile elementelor chimice au rezultat săruri care au cristalizat sub formă cubică, cu dimensiuni între 2,47-3,47 μm. Uneori, aceste cristale se lipesc împreună și formează structuri inegale în cruce, ca în figura 3.10..

Imaginile 1A, 1B și 1C din figura 3.11., oferă o perspectivă clară asupra suprafeței filmelor pe bază de Alginat care au încorporate ingredientele bioactive și modul în care microorganismele s-au dezvoltat prin crearea coloniilor mici tip fulg de zăpadă (1A) sau se suprapun între ele în colonii mari cu formă încrucișată și suprafața neregulată. Acestea au fost uniform distribuite în structura de film 1B și 1C.

Imaginile 1A', 1B' și 1C' din figura 3.11. au fost mărite de 5000x și au ilustrat densitatea populației de *Bacillus subtilis* CU1 care a fost distribuită omogen. Proba 1A' a fost mai sporadică în număr, în timp ce probele 1B' și 1C' au fost foarte consistente; acestea au fost direct corelate cu cantitatea de *Bacillus subtilis* CU1 inoculată în rețetă. Pentru imaginile 2A, 2B și 2C, situația a fost similară cu cea descrisă mai sus la formula (1). Proba 2A', mărită la 10.000x, a manifestat o expunere eterogenă a celulelor în matricea filmului de hidrocoloizi. În acest caz, un strat subțire de gel a înconjurat pereții formei tijei culturii crescute. Proba 2B' a prezentat o mare abundență de structuri tip cristal cu forme de cub și diferite dimensiuni. Pentru proba 2C', au fost obținute detalii bune despre aglomerarea și aderența culturii pure. În acest caz, citirea a fost realizată cu o mărire de 2000x.

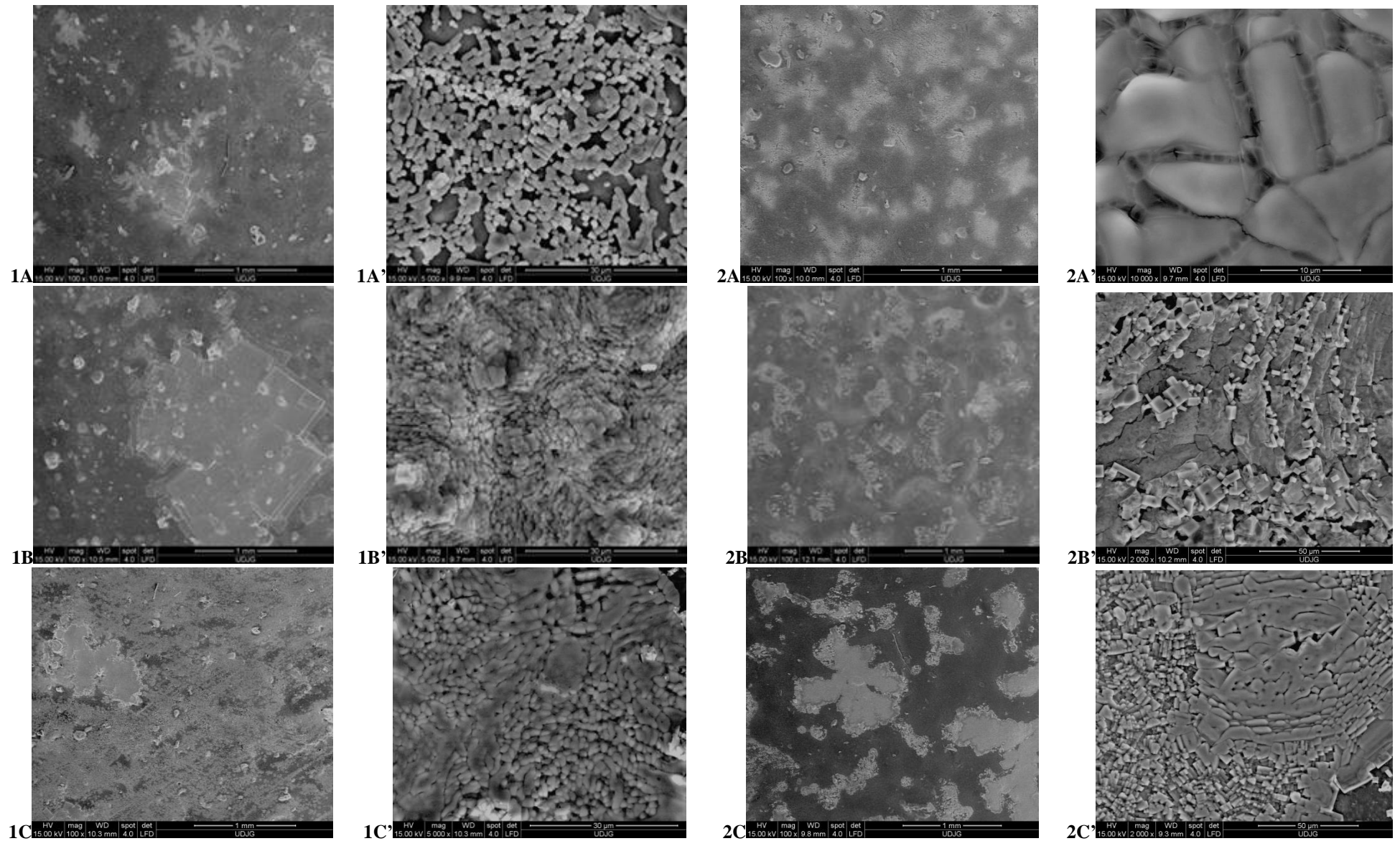


Figura 3.11. Reprezentarea filmelor încorporate cu *B. subtilis* CU1 la diferite rezoluții prin aparatura SEM.

3.3.6. Permeabilitatea filmelor bioedibile pe bază de alginat de sodiu

În tabelul 3.16. a fost înregistrată o creștere a grosimii filmelor bioedibile pe bază de alginat, direct proporțională cu creșterea concentrației de glicerol și respectiv acid oleic adăugate în formula filmului. Astfel, adiția de glicerol ca și plasticizant în rețetă poate influența ușor grosimea filmului, în schimb ce adiția de glicerol și acid oleic reprezintă o creștere mult mai limitată a grosimii. Grosimea filmelor în acest caz variază de la 0,13 mm și a ajuns până la valoarea de 0,30 mm pentru filmele cu un conținut mare de glicerol.

Tabelul 3.16. Influența concentrației de glicerol și acid oleic asupra grosimii filmelor bioedibile pe bază de alginat de sodiu.

| Proba | Glicerol, (g) | Acid Oleic, (g) | Grosime filme, (mm) |
|-------|---------------|-----------------|---------------------|
| M | 0 | 0,00 | 0,17±0,045 |
| P1 | 0,675 | 0,00 | 0,22±0,015 |
| P2 | 0,9 | 0,00 | 0,29±0,005 |
| P3 | 1,125 | 0,00 | 0,30±0,035 |
| P4 | 0,675 | 0,675 | 0,13±0,01 |
| P5 | 0,9 | 0,9 | 0,15±0,01 |
| P6 | 1,125 | 1,125 | 0,15±0,015 |

Valorile grosimii reprezintă medii±Deviația Standard, n=3.

Permeabilitatea vaporilor de apă

Potrivit standardului internațional ASTM E96, metoda de transfer de vapori prin utilizarea unor cupe/pahare poate fi descrisă în 2 moduri:

a. Metoda cupelor umplute cu sicativ. Transferul vaporilor de apă este realizat din mediul extern către interiorul cupei.

Filmele obținute prin metoda umedă au avut o permeabilitate la vapori de apă medie, cu valori de până la 38,348 g mm/kPa zi m² la o grosime a filmului de 0,30 mm, datorită formării unei rețele polimerice tridimensionale stabilizată de soluția de clorură de calciu, capturând astfel moleculele de apă care acționează ca plasticizant într-o configurație cristalină, reducându-se numărul de legături intermoleculare în lanțul polimeric și facilitând transferul de vapori de apă prin film (Pintado et al., 2010).

Permeabilitatea vaporilor de apă a variat de la valoarea de 11,115 g mm/kPa zi m² și o grosime de 0,13 mm până la un maxim de 38,348 g mm/kPa zi m² și o grosime de 0,30 mm așa cum a fost evidențiat în tabelul 3.17.

Încorporarea în formula filmului a glicerolului ca plasticizant a influențat permeabilitatea vaporilor de apă a filmelor bioedibile pe bază de alginat. Astfel, s-a putut observa o creștere a WVP odată cu creșterea concentrației de glicerol adăugat în rețetă. Cea mai evidentă valoare a WVP a fost marcată de P3b unde la o concentrație maximă de glicerol de 1,124g s-a atins o valoare a permeabilității de 38,348 g mm/kPa zi m². Spre deosebire de proba martor M, unde WVP are valoarea de 16,188 g mm/kPa zi m² la temperatura de refrigerare de 8°C, toate valorile permeabilității pentru probele cu glicerol au avut valori mai ridicate decât această valoare (de la proba P1a până la proba P3a, cu valori ale permeabilității de 19,918 g mm/kPa zi m² și respectiv 26,637 g mm/kPa zi m²). Au rezultat creșteri graduale, dar diferențiate, între probele păstrate la 8°C și cele păstrate la 22°C.

Tabelul 3.17. Parametrii de permeabilitate a filmelor bioedibile pe bază de alginat de sodiu prin metoda cupelor cu sicativ la diferite temperaturi.

| Cod Probă | t (°C) | Grosime film, (mm) | WVTR, (g/m ² zi) | WVP, (g mm/KPa zi m ²) |
|-----------|--------|--------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Ma | 8 | 0,17 | 12,69 | 16,188 |
| Mb | 22 | 0,17 | 16,63 | 21,205 |
| P1a | 8 | 0,22 | 12,07 | 19,918 |
| P1b | 22 | 0,22 | 20,06 | 33,101 |
| P2a | 8 | 0,29 | 11,41 | 24,832 |
| P2b | 22 | 0,29 | 17,63 | 38,344 |
| P3a | 8 | 0,30 | 11,84 | 26,637 |
| P3b | 22 | 0,30 | 17,04 | 38,348 |
| P4a | 8 | 0,13 | 11,40 | 11,115 |
| P4b | 22 | 0,13 | 16,52 | 16,113 |
| P5a | 8 | 0,15 | 11,31 | 12,726 |
| P5b | 22 | 0,15 | 15,66 | 17,627 |
| P6a | 8 | 0,15 | 12,12 | 13,641 |
| P6b | 22 | 0,15 | 12,50 | 14,061 |

Valorile WVTR și WVP reprezintă medii ± Deviația Standard, n=3.

În cazul menținerii filmului în condiții de refrigerare, valorile permeabilității au fost mult mai reduse decât în cazul menținerii filmului la temperatura mediului ambiantal. Pentru probele P4-P6, unde în compoziția filmului pe bază de alginat a intrat atât glicerolul, cât și acidul oleic drept plasticizanți, se poate nota o evoluție modestă și mai redusă a valorii permeabilității cu valori ce ating un maxim de 14,061 g mm/kPa zi m² în cazul probei P6b. Comparativ cu proba martor, această valoare maximă a probei P6b a fost mai redusă cu două unități.

Astfel, amestecul glicerol-acid oleic a îmbunătățit permeabilitatea filmelor bioedibile pe bază de alginat. Valorile de referință ale permeabilității probelor cu acid oleic și glicerol au fost pentru proba P4a de 11,115 g mm/kPa zi m² la temperatura de refrigerare și pentru proba P6b de 14,061 g mm/kPa zi m² la temperatura mediului ambiantal. Amestecul celor două ingrediente în acest sistem complex a contribuit la limitarea interacțiunilor intermoleculare din matricea structurală a filmelor bioedibile pe bază de alginat și, astfel, s-a redus/micșorat trecerea umidității prin film.

b. Metoda cupelor umplute cu apă distilată. Vaporii au fost transmiși din interior către exterior, interiorul fiind umplut cu apă distilată.

În cazul metodei cupelor cu apă distilată valorile permeabilității au variat în mod negativ în intervalul -90,100 g mm/kPa zi m² și o grosime de 0,30mm și -8,065 g mm/kPa zi m² și o grosime de 0,15mm (Tabelul 3.18.). Valorile negative ale parametrilor semnifică faptul că transferul de vapori s-a realizat din interiorul cupei spre exterior. Pentru probele P1-P3 s-a putut nota o scădere graduală a valorii permeabilității odată cu creșterea conținutului de glicerol din rețetă, dar acest lucru a fost invers proporțional cu creșterea grosimii filmului.

Spre deosebire de proba martor M, cu o valoare de referință de -10,284 g mm/kPa zi m² la temperatura de refrigerare, doar proba P3c a avut o valoare relativ apropiată de -16,625 g mm/kPa zi m², dar aici a intervenit și grosimea probei P3c de 0,30mm, aproape dublă față de proba martor. Pentru martorul Md, cu valoare de referință de -47,390 g mm/kPa zi m² la temperatura ambiantală, singura probă apropiată ca valoare a fost P1d, de -53,788 g mm/kPa zi m², în acest caz grosimea filmului și cantitatea de glicerol din compoziție înrăutățind parametrii

de permeabilitate. Pentru probele P4-P6 valorile permeabilității s-au îmbunătățit semnificativ datorită combinației de glicerol cu acid oleic din compoziția filmului.

Tabelul 3.18. Parametrii de permeabilitate a filmelor bioedibile pe bază de alginat prin metoda cupelor umplute cu apă distilată la diferite temperaturi.

| Cod Proba | Temperatura, (°C) | Grosime film, (mm) | WVTR, (g/m ² 24h) | WVP, (g mm/kPa zi m ²) |
|-----------|-------------------|--------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Mc | 8 | 0,17 | -8,06 | -10,284 |
| Md | 22 | 0,17 | -37,16 | -47,390 |
| P1c | 8 | 0,22 | -13,22 | -21,811 |
| P1d | 22 | 0,22 | -32,59 | -53,788 |
| P2c | 8 | 0,29 | -13,24 | -28,794 |
| P2d | 22 | 0,29 | -32,60 | -70,929 |
| P3c | 8 | 0,30 | -7,39 | -16,625 |
| P3d | 22 | 0,30 | -40,03 | -90,100 |
| P4c | 8 | 0,13 | -13,65 | -13,314 |
| P4d | 22 | 0,13 | -33,64 | -32,807 |
| P5c | 8 | 0,15 | -15,24 | -17,152 |
| P5d | 22 | 0,15 | -37,39 | -42,074 |
| P6c | 8 | 0,15 | -7,17 | -8,065 |
| P6d | 22 | 0,15 | -36,13 | -40,662 |

Valorile WVTR și WVP reprezintă medii±Deviația Standard, n=3

Valorile analizate ale permeabilității nu au depășit în acest caz pragul de -42,074 g mm/kPa zi m². Spre deosebire de proba martor Mc la temperatura de refrigerare, o valoare îmbunătățită a permeabilității a fost vizibilă pentru proba P6c de -8,065 g mm/kPa zi m². În acest caz raportul glicerol: acid oleic a fost de 1:1 și grosimea filmului a fost de 0,15 mm, reprezentând o valoare optimă pentru datele din tabelul 3.16. Pentru martorul Md la temperatura ambientală valoarea superioară ca permeabilitate a fost de -32,807 g mm/kPa zi m², corespunzând probei P4d, unde raportul glicerol:acid oleic a fost de 0,68:0,68 și grosimea filmului a fost de 0,13 mm.

3.3.7. Analiza EDS și SEM

a. Analiza EDS cantitativă

Valorile elementelor chimice constituente ale filmului au fost notate în tabelul 3.19. unde principalele elemente au fost comparate între probele realizate.

Tabelul 3.19. Compoziția chimică a filmelor bioedibile pe bază de alginat, în procente masice, pentru probele P1-P4.

| Element chimic majoritar | P1 (w/w) | P2 (w/w) | P3 (w/w) | P4 (w/w) |
|--------------------------|-------------|--------------------|--------------------|-------------|
| B | 33,36±5,74 | 33,676±5,56 | 24,308±4,56 | 28,104±4,51 |
| C | 25,218±5,62 | 15,89±5,32 | 31,742±8,13 | 27,674±7,01 |
| Cl | 6,428±1,60 | 24,614±2,28 | 15,752±4,25 | 16,77±3,98 |
| Na | 5,912±0,78 | 14,132±4,97 | 4,256±5,23 | 2,42±3,61 |
| O | 17,766±2,27 | 5,228±2,38 | 12,924±3,14 | 11,472±2,78 |
| K | 5,622±2,64 | 0,392±0,19 | 0,612±0,36 | 4,624±3,93 |
| Ca | 4,994±1,10 | 4,862±3,32 | 7,72±3,05 | 6,758±1,30 |

Valorile elementelor chimice analizate reprezintă Medii±Deviația Standard, n=5
Probabilitatea p>0,05, pe rânduri pentru n=5.

Elementul chimic majoritar evident observat în tabelul 3.33. a fost borul pentru toate cele patru probe luate în analiză, cu valori situate în intervalul 24,30 w/w și 33,67w/w. Elemente precum Na și Cl au apărut, de asemenea, în proporții considerabile datorită prezenței lor în majoritatea ingredientelor adăugate. Ionii de Na au fost prezenți în compoziția alginatului de sodiu legați de gruparea carboxil ($-\text{COONa}$) între diverse legături α -1,4 Glucuronat–Manuronat.

Ionii de Na au fost prezenți și în compoziția carboximetilcelulozei, dar și în preparatul fermentat pe bază de ceapă și urme în extractul de drojdie. Ionii de Ca și Cl au provenit din CaCl_2 adăugată pentru reticularea alginatului. Elementul C a fost întâlnit în majoritatea hidrocoloizilor folosiți ca parte organică a acestora. Valori reduse pentru elemente precum O și K au fost notate de asemenea în compoziția filmelor analizate. Oxigenul a fost prezent datorită încorporării în diversele grupări $-\text{OH}$ sau $-\text{COO}^-$ ca parte componentă a hidrocoloizilor utilizați.

b. Analiza EDS calitativă

Pentru analiza calitativă cu ajutorul razelor X, a fost necesară identificarea energiei specifice, în KeV, pentru vârfurile caracteristice fiecărui element chimic în parte (Figura 3.15.).

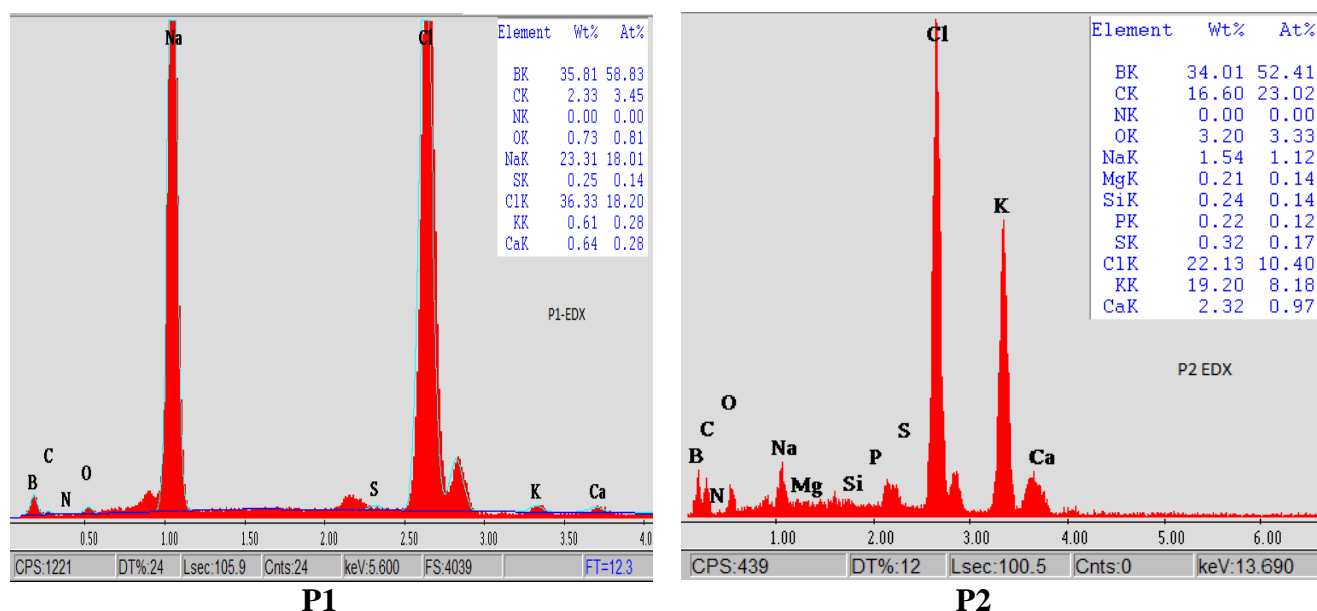


Figura 3.15. Reprezentarea schematică a Spectrului EDS pentru probele P1 și P2.

În cazul probelor P1 și P2 au rezultat valori similare ale elementului B, cu medii de 35% în probele analizate și, totodată, asemănări în ceea ce privește valorile elementului Cl punctat la valoarea de 2,50 KeV, fiind obținut din CaCl_2 adăugată pentru reticularea alginatului de sodiu. În cazul probei P1 valoarea elementului Na a fost specifică pentru o energie de 1 KeV.

Se poate observa că, în cazul probei P2, datorită adăugării unei cantități triple de extract de drojdie cu un conținut mineral bogat în potasiu, se poate nota o valoare crescută a acestuia de 19% în vârful energetic din jurul lui 3,4 KeV. Reprezentările micro-grafice ale probelor P1 și P2 atestă zonele analizate de echipamentul SEM și EDX pentru care s-au obținut valorile mai sus menționate.

În cazul probelor P3 și P4 analiza EDS calitativă a indicat vârfuri comune pentru valorile elementului chimic Cl în jurul valorii energetice de 2,5 KeV (Figura 3.16.).

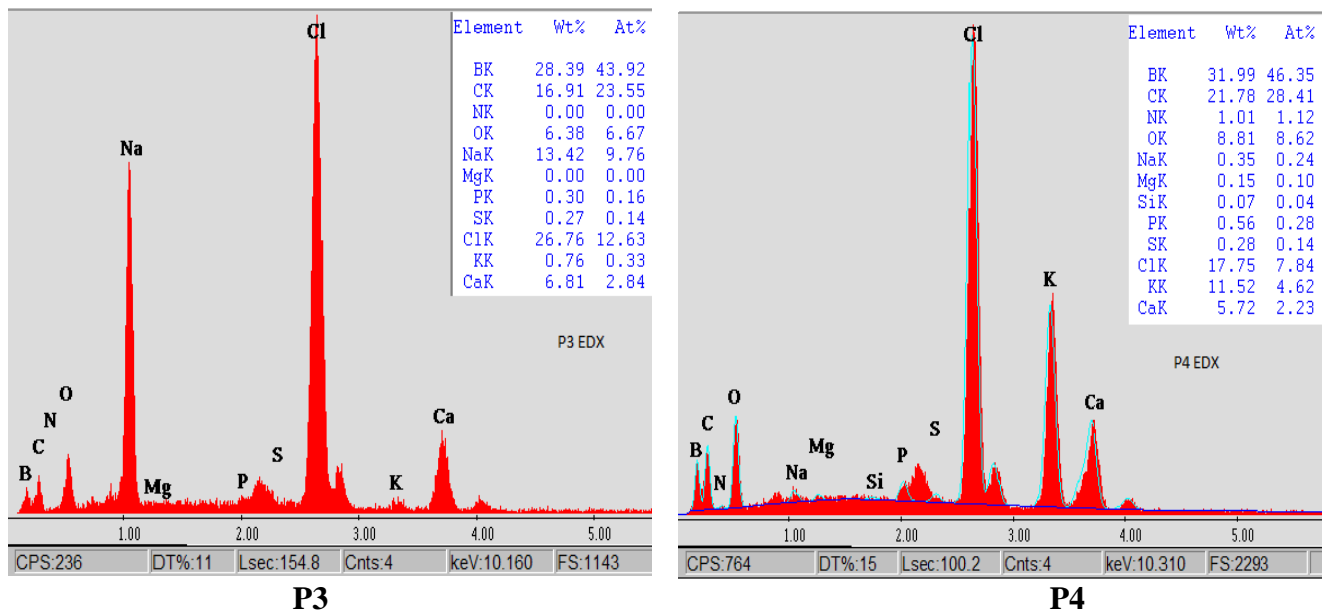


Figura 3.16. Reprezentarea schematică a Spectrului EDS pentru probele P3 și P4.

În acest caz s-au putut observa valori similare pentru ambele probe cu vârfuri nuanțate pentru elementul chimic B la valori energetice < 1KeV. Diferențe semnificative au apărut în cazul probei P3 pentru vârful specific elementului Na, aflat în abundență în acest caz, la valoarea energetică de 1 KeV și în cazul probei P4 unde s-a înregistrat un vârf semnificativ la elementul K determinat la o valoare energetică de 3,4 KeV. Acest lucru poate fi tradus prin diferențele de preparat fermentat pe bază de ceapă și extract de drojdie adăugate în cele două probe, în doze de 0,5 g pentru proba P3 și respectiv 1,5 g pentru proba P4. Aceste două extracte bioactive sunt bogate în K și Ca elemente notificate prin vârfurile din reprezentarea schematică EDS. Scanările cu ajutorul microscopului electronic ale probelor P3 și P4 au fost realizate pentru a se determina structurile acestor filme pe bază de alginat. Acestea au fost observate în probele P3 SEM și P4 SEM de mai sus și corespund cu citirile EDS din dreptul acestora.

Analiza SEM

Proba P1 (Figura 3.17.) a ilustrat o suprafață a filmului înțesată de o zonă de cristale mici de sare. Acest lucru poate fi explicat printr-o concentrație mare a elementelor Na și Cl cu valori de 23,31 w/w și respectiv 36,33 w/w din reprezentarea cantitativă EDS. Restul elementelor au fost preponderent subunitare cu valori uniforme pentru zona în cauză. În cazul acestei probe imaginea a fost mărită de 2000X. Din cauza abundenței de cristale de pe zona de analiză nu au putut fi observate fisuri ale filmului și se poate considera faptul că reticularea alginatului cu clorură de calciu s-a realizat în totalitate. Dozajul mic al componentelor bioactive din rețetă (extract de drojdie și preparat fermentat pe bază de ceapă) nu oferă detalii semnificative pentru analiza SEM.

În cazul probei P2, zona de film analizată a indicat prezența unor cristale de dimensiuni mai mari cu valori ridicate pentru elementul C de 16,60 w/w, Cl cu valoarea de 22,13 w/w și K cu valoarea de 19,20 w/w. Doza ridicată a extractului de drojdie și preparatului fermentat pe bază de ceapă din rețetă a fost mult mai evidentă aici, înregistrându-se valori mari pentru K, specifice extractului de drojdie. Filmul a prezentat fisuri la suprafață ceea ce poate indica fie

analizarea unei zone foarte subțiri ca grosime a filmului, fie o reticulare incompletă a alginatului de sodiu.

În cazul probei P3, aceasta a prezentat o suprafață înțesată cu o multitudine de cristale mari cu valori pentru elementele Na și Cl de 13,42 w/w și respectiv 26,76 w/w. Proba nu a prezentat fisuri la suprafață.

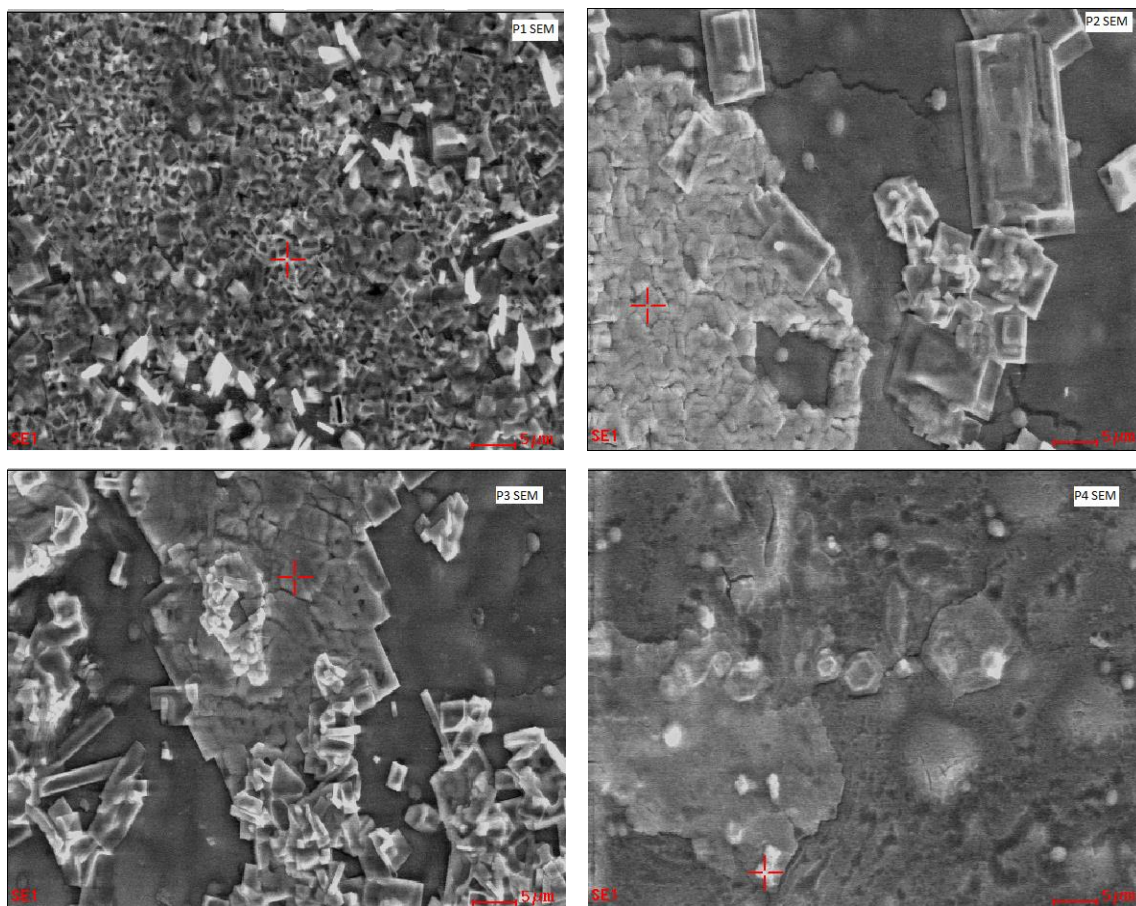


Figura 3.17. Reprezentarea SEM a filmelor bioedibile pe bază de alginat. Probele P1-P4.

Imaginea a fost mărită de 2000X. Rezultatele au evidențiat faptul că, similar cu proba P1, și în acest caz, dozajul redus al componentelor active a făcut imposibilă detectarea elementelor specifice la analiza SEM. În cazul probei P4, aceasta a prezentat o distribuție uniformă și lipsa fisurilor, deci o îmbunătățire a proprietăților mecanice a filmului. În acest caz valoarea pentru elementul K a fost de 11,32 w/w, element specific extractului de drojdie.

3.3.8. Analiza FTIR

În figura 3.19, vârfurile energetice ale vibrațiilor alungite simetrice ale grupării carboxil apar în cazul valorii de 1405 cm^{-1} . Al doilea vârf energetic a fost evidențiat în jurul valorii de 1596 cm^{-1} și a fost asociat cu vibrațiile alungirii asimetrice a grupării carboxil (COO^-) a alginatului de sodiu. [Jaya et al. \(2009\)](#) și [Huang et al. \(1999\)](#) au descoperit de asemenea benzi de absorbție pentru alginatul de sodiu în jurul valorilor de 1320 cm^{-1} (gruparea C-O), 1120 cm^{-1} (gruparea C-C), 1090 cm^{-1} (gruparea C-O), 1020 cm^{-1} (gruparea C-O-C) și 950 cm^{-1} (gruparea C-O care a fost atribuită structurii glucidice a alginatului de sodiu). În cazul de față, vârfuri energetice ale alginatului de sodiu analizate individual au putut fi observate în jurul valorilor de: 1294 cm^{-1} (C-O), 1080 cm^{-1} (C-O), 1024 cm^{-1} (C-O-C) și 947 cm^{-1} (C-O), care sunt valori

similare cu cele mai sus menționate. Spectrele FTIR au fost utilizate pentru a determina raportul M/G al alginatului de sodiu pentru vârfurile de absorbție caracteristice la 1024 și 1080 cm^{-1} .

Raportul mediu de absorbție (A_{1024}/A_{1080}) pentru alginatul de sodiu a fost 0,94. Acest rezultat a fost similar cu rezultatele obținute de [Vivian Florian-Algarin și Aldo Acevedo \(2010\)](#).

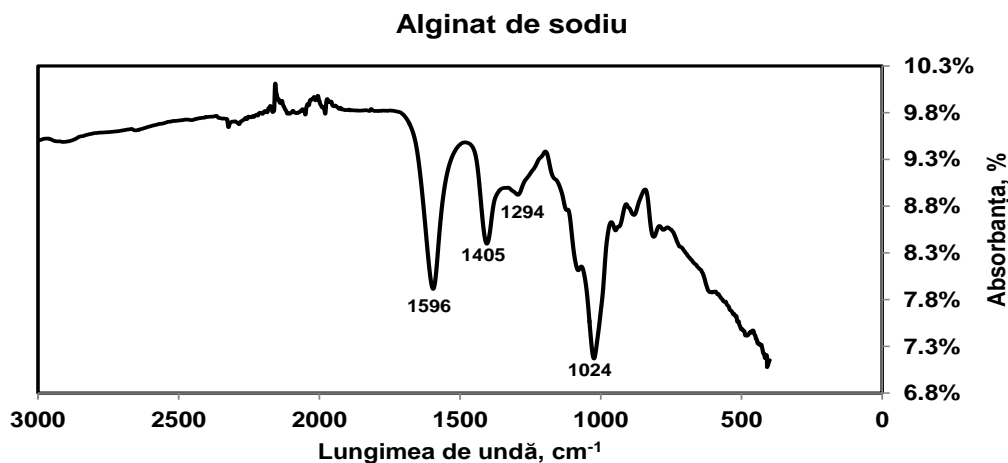


Figura 3.19. Spectrul FTIR pentru alginatul de sodiu folosit la obținerea filmelor bioedibile analizat ca mono component.

Potrivit [Distantina et al. \(2011\)](#), în studiul carrageenanului cu ajutorul spectroscopiei FTIR a fost remarcată prezența unei absorbții de bandă foarte puternice în regiunea 1210-1260 cm^{-1} (datorită grupării S=O a sulfaților de ester) și 1010-1080 cm^{-1} (atribuit grupărilor glicozidice) prezente în toate tipurile de carrageenan. Celelalte grupări chimice sunt caracteristice doar pentru kappa-carrageenan, și anume 3,-6-anhidro-D-galactoză la 928-933 cm^{-1} și D-galactoz-4-sulfat la 840-850 cm^{-1} . Spectrele FTIR pentru kappa-carrageenan prezintă și o bandă de absorbție în intervalul 840-850 cm^{-1} .

În figura 3.20. pot fi identificate benzi puternice specifice pentru 1225 cm^{-1} (gruparea S=O), 925 cm^{-1} și 1035 cm^{-1} (gruparea C-O) și 842 cm^{-1} (gruparea C-O-SO₄).

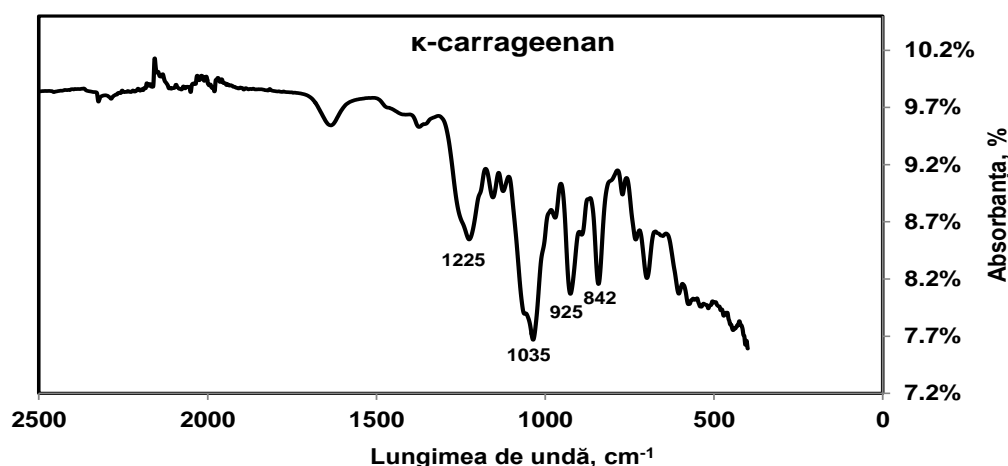


Figura 3.20. Spectrul FTIR pentru k-carrageenan folosit la obținerea filmelor bioedibile analizat ca mono component.

Rezultate similare celor obținute mai sus au fost notate și de [Pereira et al. \(2009\)](#), care a cartografiat cu ajutorul spectroscopiei FTIR-ATR aproximativ șase tipuri distincte de carrageenan în vederea identificării compoziției acestora.

În figura 3.21. au fost înregistrate benzi reprezentative, cu intensități și/sau zone integrate afectate de carboximetilare la valori de 1321 cm^{-1} și 1588 cm^{-1} , atribuite vibrațiilor de expansiune carbonil (gruparea C-O). Rezultate similare au fost obținute și de [Yuen et al. \(2009\)](#) pentru benzi de absorbție a căror valori au atins vârfuri de 1315 cm^{-1} și respectiv 1605 cm^{-1} . În cazul vârfurilor înregistrate la valoarea de 1018 cm^{-1} , acestea pot fi atribuite grupărilor (C-O-H).

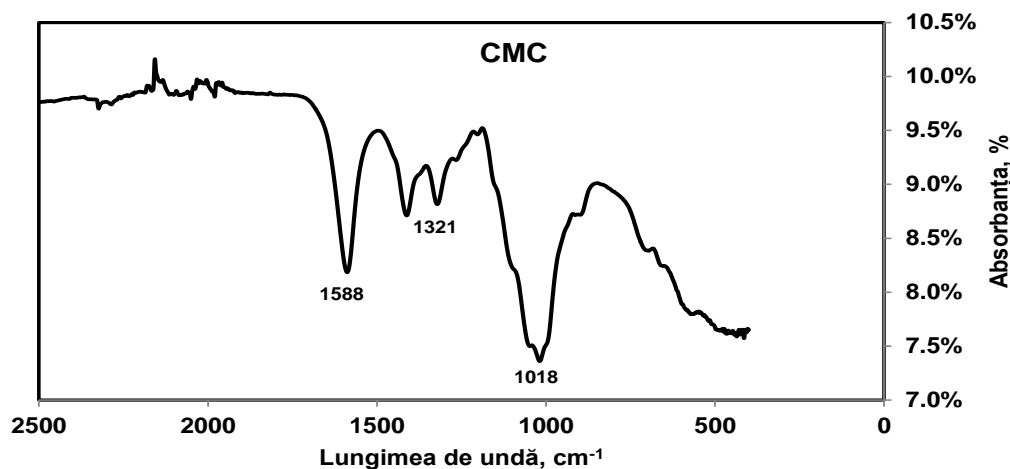


Figura 3.21. Spectrul FTIR pentru CMC folosit la obținerea filmelor bioedibile analizat ca mono component.

În figura 3.22. au fost reprezentate principalele vârfuri caracteristice ale Gumei Konjac cu valori la 3333 cm^{-1} (gruparea O-H), 2887 cm^{-1} (gruparea C-H), 1621 cm^{-1} (gruparea C=O), 1148 cm^{-1} (gruparea O=O) și 1013 cm^{-1} (gruparea C-O). Rezultate similare au fost obținute de [Huacai et al. \(2006\)](#) și [Yu et al. \(2007\)](#), care au studiat în detaliu și relația dintre zaharurile componente pentru acest polimer.

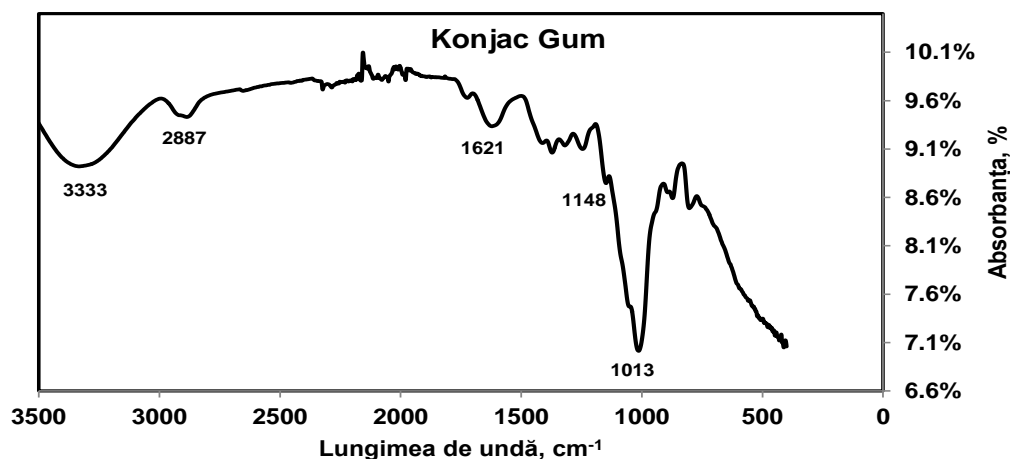


Figura 3.22. Spectrul FTIR pentru Guma Konjac folosită la obținerea filmelor bioedibile analizat ca mono component.

În figura 3.23 (M, 1A, 1B, 1C) și figura 3.24. (M, 2A, 2B, 2C) au fost ilustrate benzile de absorbție pentru spectrele FTIR în regiunea $950\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ ale celor două rețete.

Prezența legăturilor eterice din polizaharide poate fi verificată prin identificarea unor benzi de absorbție intense situate în regiunea *fingerprint*, adică la lungimi de undă cuprinse între $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$. S-a putut observa că spectrele suprapuse au prezentat absorbții identice în zona de *fingerprint*, aceasta dovedind cu certitudine că probele analizate au conținut compuși cu structuri de același tip.

Benzile de absorbție din jurul valorii de $1050-1080\text{ cm}^{-1}$ au sugerat prezența unor grupări C-O, grupări specifice alginatului de sodiu ce reprezintă componenta principală utilizată la obținerea acestor filme bioedibile. Datorită dozajului redus al ingredientelor bioactive încorporate în matricea filmului, nu au putut fi înregistrate diferențe considerabile, clare, care să indice prezența acestor compuși în spectrele FTIR ale filmelor analizate.



Figura 3.23. Spectrele FT-IR pentru probele filmelor M, 1A, 1B și 1C pe bază de alginat cu ingrediente bioactive încorporate.

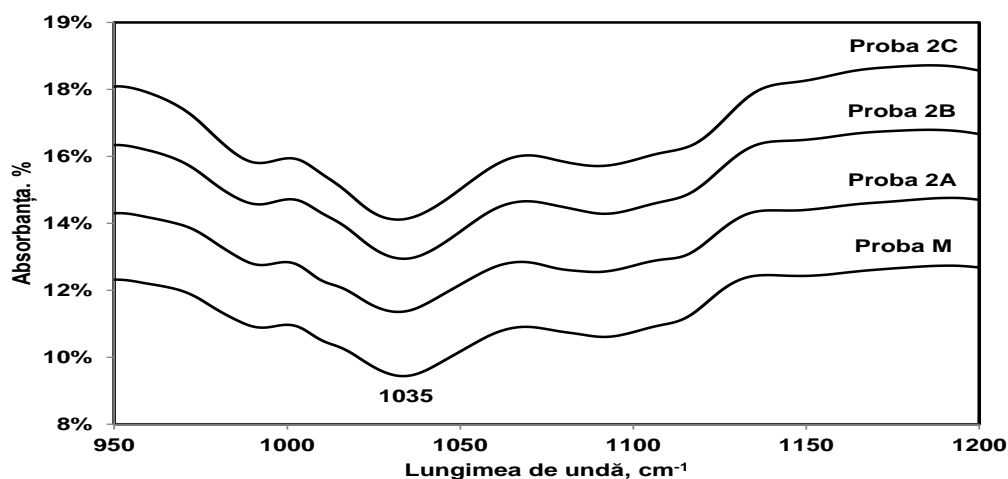


Figura 3.24. Spectrele FT-IR pentru probele filmelor M, 2A, 2B și 2C pe bază de alginat cu ingrediente bioactive încorporate.

În cazul celor două seturi de rețete ilustrate se pot observa diferențe minore referitoare la adăugarea de compuși activi pentru fiecare din versiunile prezentate. Acest lucru se datorează cantităților mici de acizi organici, substanțe antimicrobiene, metaboliți și substanțe antioxidante prezente pe zona specifică a filmului analizat prin spectroscopie în infraroșu.

Totuși, a putut fi observată o variație semnificativă între filmele din figura 3.23. și cele din figura 3.24. în ceea ce privește variația vârfurilor energetice localizate în zona lungimii de undă specifice grupărilor vibraționale C-O cu valoarea de 1035 cm^{-1} și grupărilor C-C specifice valorii de 1075 cm^{-1} .

3.3.9. Proiectarea experimentală

În cazul filmelor bioedibile pe bază de alginat se urmărește atingerea unei valori minime pentru WVP și WVTR pentru a se reduce din permeabilitatea membranei la vapori; astfel, se va opta pentru varianta “*Minimize*” pentru Optimizarea acestui răspuns.

Figurile 3.25. și 3.26. ilustrează o comparație a interacțiunilor dintre două componente, înainte și după aplicarea optimizării rețetei la valorile permeabilității vaporilor de apă selectate.

În cazul interacțiunii dintre umiditatea relativă și temperatură s-a putut observa din punct de vedere al modelului experimental o menținere a valorii umidității relative între valorile de 50-55%, dar în modelul optimizat se evidențiază o modificare semnificativă a componentei grosime de la valoarea standard de 0,22 mm până la o valoare recomandată de 0,15 mm. O astfel de grosime recomandată este specifică în cazul probelor analizate pentru versiunile P5 și respectiv P6, adică un conținut ridicat de glicerol: acid oleic între 0,9-1,12g; valori ale WVTR între 11,31-15,66 g mm/ zi m² și valori ale WVP între 12,72 și 17,62 g mm/ kPa zi m².

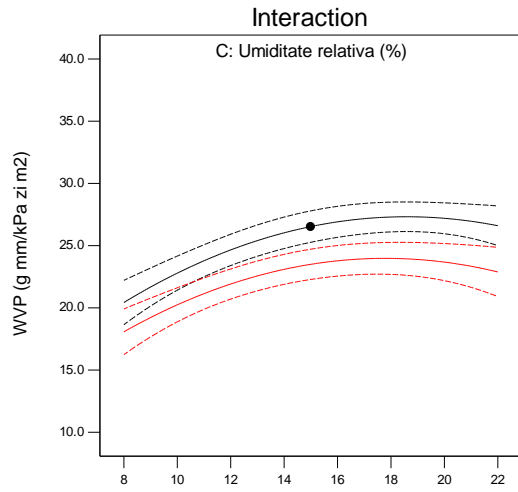
Pentru graficele interacțiunii dintre temperatură și grosimea filmului poate fi menționat faptul că în ambele cazuri se poate observa o creștere a permeabilității vaporilor de apă odată cu creșterea temperaturii. Domeniul de temperatură analizat este 8-22°C, iar umiditatea relativă după optimizarea componentelor ajunge la valoarea de 54,26%.

În acest caz, valoarea permeabilității vaporilor de apă pentru rezultate optime atinge valoarea de 12,76 g mm/ kPa zi m². În cazul interacțiunii dintre componentele umiditate relativă și grosimea filmului se pot observa variații ale umidității relative în funcție de grosimea filmului analizat. Graficul optimizat rezultat în urma proiectării experimentale cu ajutorul programului Unscrambler ne-a furnizat o gamă de valori recomandate a filmului cu: o grosime de 0,15 mm o temperatură de 8°C și o umiditate relativă de 54,26%.

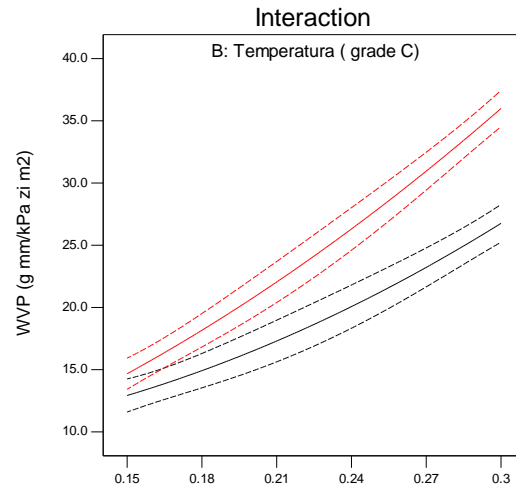
Valorile analizate au indicat o valoare semnificativă din punct de vedere experimental prin aplicarea unui model de predictibilitate care poate fi observat în tabelul 3.20. Astfel, pentru valori ale lui R² de 0,9680, modelul Quadratic a fost cel sugerat de către program și poate reprezenta cel mai bun răspuns pentru experimentul în cauză. O altă valoare interesantă din punct de vedere statistic a fost valoarea lui P (probabilitatea), ca ipoteza aleasă să fie corectă pentru valori ale lui p<0,05. În acest caz, valoarea lui p<0,0033, a indicat un experiment statistic relevant și a cărui ipoteză se confirmă.

Tabelul 3.20. Reprezentarea modelului de predictibilitate recomandat pentru optimizare

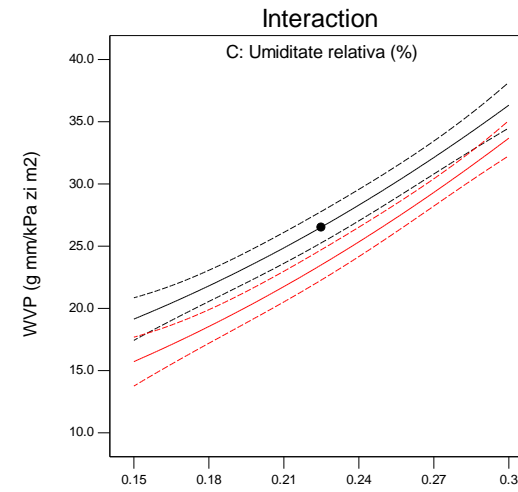
| Sumar Tabel Predictibilitate | | | | |
|------------------------------|---------------|---------------|---------------|--------------------------------|
| | Sequential | Lack of Fit | Adjusted | Predicted |
| Source | p-value | p-value | R-Squared | R-Squared |
| Linear | < 0.0001 | 0.0175 | 0.9296 | 0.9089 |
| 2FI | 0.0010 | 0.0884 | 0.9673 | 0.9558 |
| Quadratic | <u>0.0033</u> | <u>0.3528</u> | <u>0.9846</u> | <u>0.9680</u> <u>Suggested</u> |
| Cubic | 0.3528 | | 0.9881 | Aliased |



B: Temperatura (grade C)

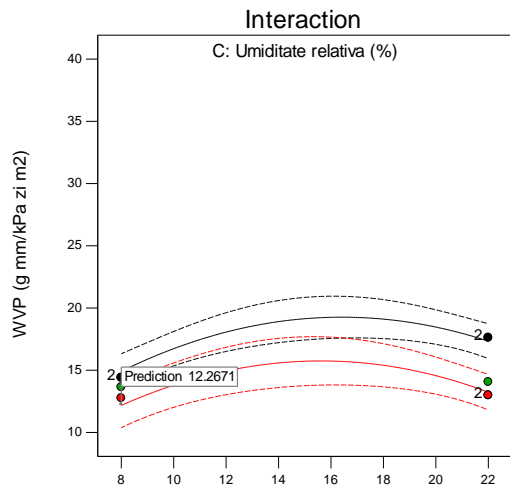


A: Grosime film (mm)

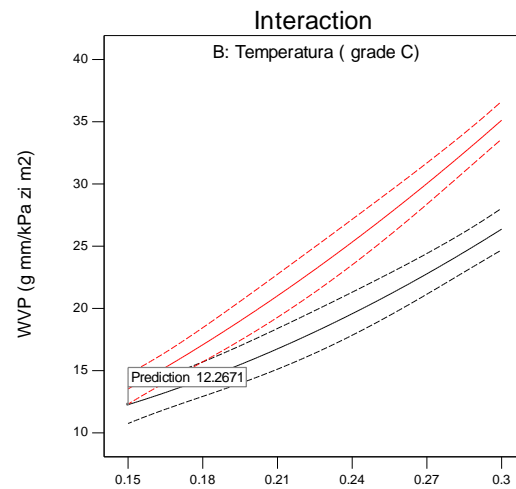


A: Grosime film (mm)

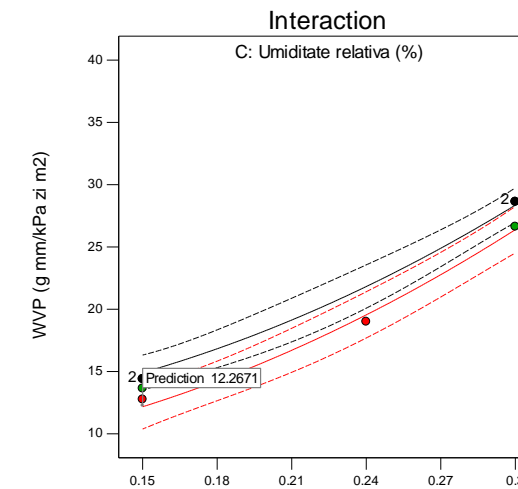
Figura 3.25. Interacțiunea componentelor experimentului înainte de Optimizare.



B: Temperatura (grade C)



A: Grosime film (mm)



A: Grosime film (mm)

Figura 3.26. Interacțiunea componentelor după Optimizarea WVP la valoarea minimă de 12,76 g mm/kPa zi m².

| | | |
|------------------------------|----------------------|----------------------------|
| RH%: 50-55% | Temperatura: 8-22 °C | RH%: 50-55% |
| Grosime: 0,225 mm----0,15 mm | RH%: 52,5%----54,26% | Temperatura: 15 °C----8 °C |

Experimental, conform tabelului 3.21., se poate atinge un factor de Dezirabilitate în jurul valorii de 0,972 ceea ce indică o valoare cu o probabilitate mare pentru a valida ipoteza analizată.

Tabelul 3.21. Graficul Desirabilitatii optime alese de program pentru îmbunătățirea permeabilității filmelor pe bază de alginat de sodiu.

| Soluții | | | | | | | | |
|---------|--------------|--------|--------|-----------------------------------|----------------------------|---------------------|--------------|-----------------|
| Nr. | Grosime (mm) | t (°C) | RH (%) | WVP (g mm/kPa zi m ²) | WVTR (g/m ² zi) | Dezirabilitate (<1) | w/o Interval | |
| 1 | 0.150 | 8.000 | 54.279 | 12.265 | 11.071 | 0.972 | 1.000 | Selected |
| 2 | 0.150 | 8.000 | 54.303 | 12.260 | 11.060 | 0.972 | 1.000 | |
| 3 | 0.150 | 8.001 | 54.254 | 12.271 | 11.083 | 0.972 | 1.000 | |

Figura 3.27.a. ilustrează grafic atingerea acestei valori, în care Dezirabilitatea a fost factorul principal analizat, având ca factori complementari temperatura și umiditatea relativă recomandată pentru menținerea filmului. Raportul dintre cauzalitate și corelație poate fi identificat printr-o conexiune directă între Dezirabilitate ca parametru analizat și ceilalți doi factori, în sensul că, odată cu creșterea valorii temperaturii, se poate observa o scădere a valorii Dezirabilității (de exemplu pentru t=16°C avem o valoare D=0,75). Același lucru este valabil și în cazul umidității relative care, odată ajunsă la valoarea de RH=52%, va influența valoarea D=0,78. Astfel, valorile temperaturii și umidității relative au avut un efect direct asupra dezirabilității și totodată asupra permeabilității filmului analizat.

În cazul permeabilității vaporilor de apă, în Fig. 3.27.b. poate fi observată o valoare precisă a acesteia de 12,267 g mm/kPa zi m² ca și optimizare realizată. Grosimea filmului în acest caz a fost de 0,15 mm, iar parametrii temperatură și umiditate relativă au fost direct dependenți de valorile WVP. Astfel, valoarea permeabilității crește direct proporțional cu valoarea temperaturii (de exemplu, dacă se atinge t=16°C, atunci WVP=18 g mm/kPa zi m²). În cazul umidității relative a aerului, dacă RH=51%, atunci WVP= 17 g mm/kPa zi m². Se poate concluziona faptul că temperatura, umiditatea relativă și grosimea filmului au o influență majoră asupra permeabilității filmelor pe bază de alginat de sodiu.

În cazul WVTR (Fig. 3.27.c.), o valoare predictibilă se regăsește în jurul valorii de 11,06 g mm/kPa. Similar cu WVP, pentru WVTR poate fi identificată o corelație directă între temperatură, grosimea filmului și umiditatea relativă. Astfel, odată cu creșterea valorilor acestor parametri se poate identifica o creștere imediată a valorilor pentru WVTR.

Conform predicțiilor oferite de modelul experimental cea mai apropiată versiune ce poate fi ușor optimizată către ipoteza ideală poate fi dată de proba P5a cu parametrii prezentați în tabelul 3.22.

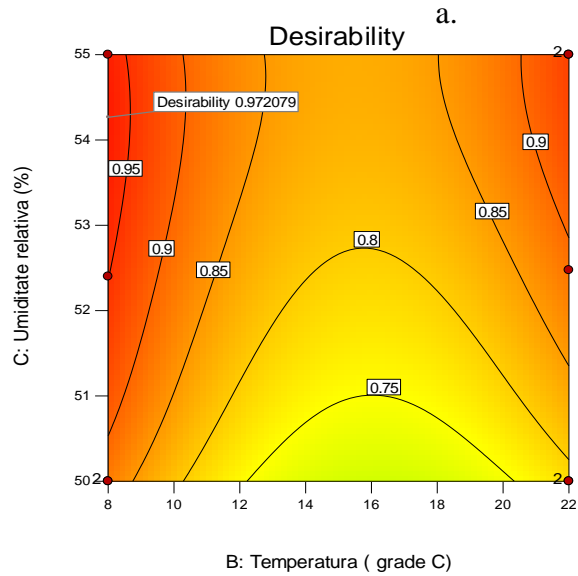
Tabelul 3.22. Proba filmului bioedibil pe bază de alginat sugerată drept ideală prin modelare experimentală

| Cod Proba | Glicerol:Ac. Oleic (g) | t (°C) | Grosime film, (mm) | WVTR, (g/m ² zi) | WVP, (g mm/kPa zi m ²) |
|-----------|------------------------|--------|--------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| P5a | 0,9:0,9 | 8 | 0,15 | 11,31 | 12,72 |

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Desirability
 ● Design Points
 1
 0

X1 = B: Temperatura
 X2 = C: Umiditate relativa

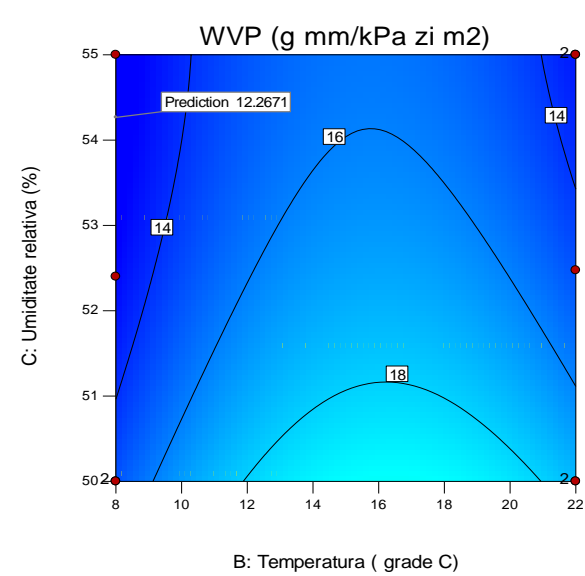
Actual Factor
 A: Grosime film = 0.15



Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 WVP (g mm/kPa zi m2)
 ● Design Points
 38.34
 12.76

X1 = B: Temperatura
 X2 = C: Umiditate relativa

Actual Factor
 A: Grosime film = 0.15



Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 WVTR (g mm/kPa)
 ● Design Points
 17.04
 9.44

X1 = B: Temperatura
 X2 = C: Umiditate relativa

Actual Factor
 A: Grosime film = 0.15

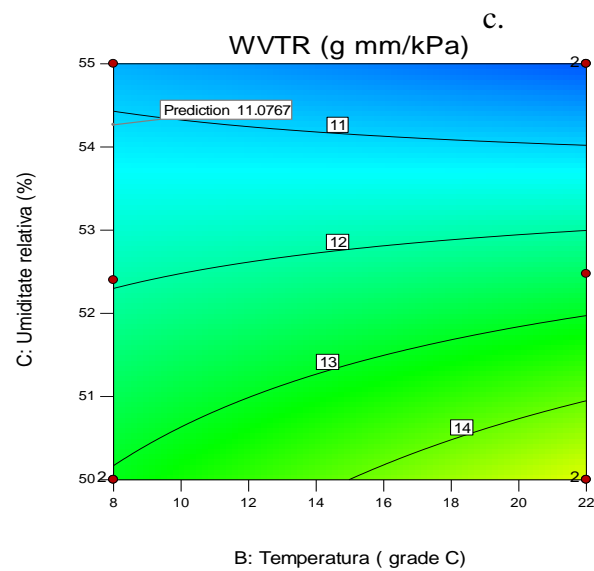


Figura 3.27. Reprezentarea grafică prin modelare experimentală a valorilor recomandate pentru filmul bioedibil pe bază de alginat de sodiu:

- a. Dezirabilitate
- b. WVP
- c. WVTR

3.4. Concluzii parțiale privind studiul filmelor bioedibile pe bază de alginat

- Formula optimă, din punct de vedere al comportamentului reologic, cu proprietăți elastice și o rezistență sporită a fost stabilită de formula: 5% AL, 0,5% CMC și 0,5% KG și poate servi drept matrice suport pentru diferitele ingrediente bioactive ce vor fi încorporate în formula finală.
- Capacitatea antioxidantă a elementelor active încorporabile ca: extract de drojdie și preparat fermentat pe bază de ceapă a putut fi determinată și a înregistrat valori similare cu cele din alte studii de referință.
- Analiza microbiologică a filmelor pe bază de alginat a arătat faptul că, atât în cazul determinărilor efectuate pentru ingredientele bioactive individual, cât și în cazul determinărilor realizate pentru filmele pe bază de alginat ce înglobează aceste ingrediente, rezultatele au avut valori mai mari de 10^8 ufc/g după intervalul de timp stabilit. În cazul ingredientelor bioactive individuale, proba P2 (*Bacillus subtilis* CU1+ extract de drojdie) a avut o valoare de $4,15 \times 10^8$ ufc/g care reprezintă un rezultat de luat în considerare pe parcursul celor 8 zile de studiu. În cazul filmelor pe bază de alginat cu ingrediente bioactive încorporate se poate menționa formula 2, adică AL + CMC + RC + KG și amestecul de (*Bacillus subtilis* CU1+ extract de drojdie + preparat fermentat pe bază de ceapă), care reprezintă varianta cu cel mai mare rezultat din punct de vedere al viabilității microorganismului, atingându-se un număr de $1,8 \times 10^9$ ufc/g la sfârșitul studiului.
- În cazul Metodei cupelor umplute cu sicativ, experimentul a arătat faptul că WVP a avut cele mai bune valori localizate în intervalul 11,11 g mm/kPa zi m^2 și 12,72 g mm/kPa zi m^2 , adică la grosimi situate între 0,13-0,15 mm și respectiv temperatura de 8°C, la care raportul între plasticizantii glicerol: acid oleic adăugați în compoziția filmului a fost de 1:1. Astfel, filmele realizate din amestecul hidrocoloizilor reprezentați de proba P4a și respectiv P5a, au fost filmele optime pentru acoperirea și protecția împotriva vaporilor de apă a unui produs alimentar.
- În cazul Metodei cupelor umplute cu apă distilată, WVP a avut cele mai bune valori localizate în intervalul -8,06 g mm/kPa zi m^2 și -13,31 g mm/kPa zi m^2 adică la grosimi situate în jurul valorii de 0,13mm și 0,15 mm și temperatura de 8°C.
- Analiza EDS-SEM calitativă și cantitativă poate ilustra grafic suprafețele celor patru probe analizate urmărind totodată linearitatea și structura uniformă sau neregulată a filmelor în cauză. Astfel, pentru proba P1 suprafața filmului a fost plină de cristale mici uniform distribuite, fără fisuri la suprafața filmului. Proba P2 a prezentat o suprafață neregulată cu cristale mici și mari deopotrivă, dar filmul a prezentat fisuri/crăpături la nivelul inferior. Probele P3 și P4 au prezentat suprafețe neregulate cu cristale de dimensiuni diferite fără fisuri la nivelul filmului.
- Analiza FTIR a sugerat faptul că straturile de alginat de sodiu, reprezentând materialul cel mai abundent din rețetă, stabilește interacțiuni sinergice cu ceilalți hidrocoloizi adăugați, obținându-se astfel o matrice optimă pentru componentele active.
- Proiectarea experimentală. Optimizarea compoziției amestecului filmului bioedibil a fost realizată cu ajutorul unui model experimental care a ajutat în acordarea fină a unor parametri cheie în ceea ce privește componentele analizate și răspunsurile acestora. Conform predicțiilor oferite de modelul experimental se poate spune că cea mai apropiată versiune ușor optimizabilă către ipoteza ideală este oferită de proba P5a cu parametrii: raportul glicerol:acid oleic de 0,9:0,9, temperatura optimă de 8°C, grosimea filmului de 0,15 mm, WVTR = 11,31 g / zi m^2 și WVP = 12,72 g mm/kPa zi m^2 .

IV. Obținerea experimentală a unui baton vegetal umplut în membrană de alginat cu ingrediente bioactive încorporate

4.1. Introducere

Acest capitol include obținerea și aplicarea filmului funcțional bioedibil pe suprafața unor matrici alimentare complexe de tip baton vegetal. În această parte a tezei au fost realizate analize microbiologice pentru două matrici: un baton vegetal ambalat în membrană de colagen/poliamică și batonul vegetal ambalat în filmul bioedibil funcțional. Analiza fizico-chimică a ambelor produse a fost realizată în paralel cu ajutorul aparaturii de laborator.

În tabelul 4.3. a fost prezentată formula de obținere pentru un baton vegetal cu un aport echilibrat de proteine, fibre, lipide și substanțe nutritive conceput ca o alternativă benefică la tradiționalele produse de origine animală.

Tabelul 4.3. Formula de obținere a unui baton vegetal în membrană de alginat de sodiu. Ingrediente în procente masice, %.

| Ingredient | % |
|--|-----------------|
| Apă | 58,00 % |
| Ulei floarea soarelui | 13,00 % |
| Făină de năut (23% proteină) | 10,00 % |
| Făină de in (40% proteină) | 9,80 % |
| Amestec funcțional (proteină de mazăre și carrageenan rafinat) | 4,00 % |
| Conservant (preparat fermentat pe bază de ceapă, standardizat) | 3,00 % |
| Sare alimentară | 1,50 % |
| Amestec condimente (piper, paprica dulce, pudră sfeclă roșie) | 0,70 % |
| Antioxidant (extract de ceai verde, standardizat) | 0,03 % |
| Total | 100,00 % |

4.4. Materiale și metode

4.4.1. Materiale

În experimentări s-au folosit următoarele materiale cu codificările aferente: făină proteică de năut (23% proteină), producător Naturis, Italia; făină proteică de in (40% proteină), producător Food Solutions Team, Elveția; ulei de floarea soarelui, producător Argus, Constanța, România; mix de condimente (piper, paprica dulce, pudră de sfeclă roșie), producător Harke Group, Germania; amestec funcțional personalizat (proteină de mazăre și carrageenan rafinat), producători: AGT Foods, Canada și respectiv Danisco, Danemarca; conservant (preparat fermentat pe bază de ceapă), denumire comercială: SLR100, producător: Fi&S, Olanda; antioxidant (extract de ceai verde), producător: Danisco, Danemarca; [CMC] –sodium carboximetilceluloza, producător Ashland, SUA; [AL] -Alginat de sodiu, producător Caldic Ingredients, Rotterdam, Olanda; [RC] -Carrageenan Rafinat, producător BLG-Brilliant Gum, Shanghai, China; [KG] -Konjac mannan, producător Food Ingredients & Solutions, Olanda; Mediu de cultură selectat Luria Bertani Agar, Miller, producător Compania Titan Biotech Ltd., Rajasthan, India; [ED] –Extract de drojdie, producător Compania BioSpringer, Maison Allfort, Franța; [PFC] –Preparat fermentat pe bază de ceapă, producător Compania Fi&S, Olanda; Glicerol și Acid Oleic au fost utilizați ca plasticizanți, producător Sigma Aldrich, Germania; CaCl₂ folosită ca agent de reticulare a fost furnizată de Compania Sigma Aldrich.

Investigațiile au urmărit:

- Determinarea culorii, pH-ului și tartinabilității pentru un baton vegetal în membrană de alginat
- Analiza microbiologică comparativă pentru un baton vegetal în membrană de alginat și collagen
- Analiza senzorială pentru cele două tipuri de batoane vegetale
- Analiza SWOT

4.5. Rezultate și discuții

4.5.2. Caracterizarea fizico-chimică

Efectul adaosului făinii de năut și făinii de in, precum și învelișul de tip membrană colagenică din alginat de sodiu cu ingrediente bioactive încorporate a dus la obținerea unui baton vegetal tip Frankfurter cu proprietăți fizico-chimice diferite față de un produs similar din carne de porc, vită sau pește. În tabelul 4.6. este prezentată compoziția chimică a celor două făinuri proteice vegetale.

Tabelul 4.6. Compoziția chimică a făinurilor proteice de năut și in utilizate conform fișelor tehnice din Anexa 6

| Produs | Substanță uscată, % | Cenușă, % | Lipide, % | Proteine totale, % | Carbohidrați, % | Fibre totale, % |
|---------------|---------------------|-----------|-----------|--------------------|-----------------|-----------------|
| Făină de năut | 91,4 | 3 | 7 | 22 | 58 | 11 |
| Făină de in | 92 | 5,1 | 8,8 | 40,3 | 37,7 | 33,8 |

Ambele sortimente de făinuri au prezentat un conținut proteic ridicat precum și un conținut de fibre totale peste valorile medii. Astfel, dacă în cazul făinii proteice de năut, conținutul proteic ajunge la valoarea de 22%, în cazul făinii proteice de in conținutul proteic ajunge la o valoare aproape dublă de 40,3%. În cazul conținutului total de fibre pentru făina proteică de năut valoarea minimă a fost de 11% spre deosebire de valoarea făinii proteice din in care a ajuns la 33,8%. Pentru ambele sortimente de făinuri proteice se pot observa valori relativ reduse ale conținutului de lipide în intervalul 7-9%. Totuși, semințele, făinurile și proteinele de in au un conținut de ingrediente alimentare funcționale importante datorită conținutului lor bogat de acid α -linolenic (ALA, acid gras omega-3), lignani și fibre.

Determinarea culorii

În tabelul 4.7. au fost redate valorile parametrilor de identificare a produsului baton vegetal tip Frankfurter în membrană de alginat și membrană de collagen. Încorporarea ingredientelor bioactive în membrana pe bază de alginat a avut un rezultat nesemnificativ ($p > 0,05$) modificări de luminozitate, culoare roșie și culoare galbenă.

Tabelul 4.7. Valorile unor parametri precum culoare, tartinabilitate, pH și substanță uscată pentru batonul vegetal tip Frankfurter

| Membrană | Culoare | | | Tartinabilitate, Pa | pH | S.u., % |
|----------|------------|------------|-------------|---------------------|------------|---------|
| | L* | a* | b* | | | |
| Alginat | 64,7±0,010 | 6,05±0,025 | 27,72±0,035 | 63,09±0,070 | 6,20±0,140 | 45,19 |
| Colagen | 62,5±0,035 | 6,87±0,015 | 28,27±0,055 | 79,43±0,071 | 6,24±0,014 | 52,37 |

Valorile prezintă medii ± Deviația Standard, n=2, ($p > 0,05$)

În cazul culorii galben pentru valorile lui b^* , membrana din collagen a prezentat o nuanță ușor mai pronunțată cu o valoare de 28,27, spre deosebire de membrana din alginat cu o valoare de 27,72. Această ușoară diferență de culoare reiese și din Figura 4.2. (c și d) care prezintă imaginea detaliată a celor două sortimente de membrane folosite pe o compoziție din carne și una vegetală.



Figura 4.2. Frankfurter din carne de porc în membrană din alginat de sodiu și collagen (a și b); Baton vegetal tip Frankfurter în membrană din alginat de sodiu și collagen (c și d).

Culoarea gălbuie și lăptoasă a membranelor pe bază de alginat de sodiu cu ingrediente bioactive încorporate nu a influențat, în cazul unui baton vegetal, culoarea produsului finit, spre deosebire de utilizarea unei membrane collagenice normale. Acest lucru se datorează și compoziției vegetale a batoanelor care maschează într-o oarecare măsură calitatea și culoarea membranelor utilizate.

Determinarea tartinabilității

Rezultatele obținute în urma analizei profilului de textură pentru batoanele vegetale obținute au fost prezentate în tabelul 4.7.. Din valorile înregistrate pentru tartinabilitatea exprimată ca "prag de curgere", putem observa că aceasta a scăzut semnificativ ($p < 0,05$), odată cu substituirea membranelor din collagen cu cele pe bază de alginat de sodiu. Acest lucru se datorează grosimii reduse și permeabilității vaporilor de apă mari a membranelor pe bază de alginat de sodiu. Același comportament WVP a fost observat pentru filmele comestibile pe bază de polizaharide în studiul odată cu creșterea grosimii datorită naturii neliniare a izotermelor de sorbție. Permeabilitatea vaporilor de apă este un proces dinamic. Vaporii de apă petrec mai mult timp în filme groase provocând la o abordare mai atentă a valorii umidității de echilibru.

În figura 4.3. se observă faptul că tartinabilitatea, exprimată în Pascali, păstrează o anumită constanță până la o deformare de 40 Pa.

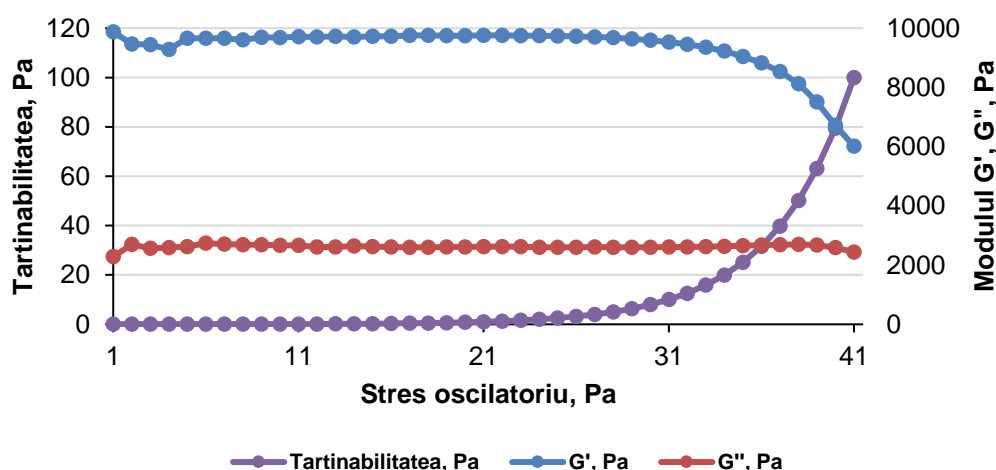


Figura 4.3. Tartinabilitatea exprimată ca "prag de curgere" pentru batonul vegetal în membrană de collagen.

După valoarea de 40 Pa, s-a observat o reducere a modului elastic G' . Modulul vâscos G'' a rămas aproximativ constant ca evoluție pe tot domeniul de liniaritate. În urma testului de tartinabilitate s-a stabilit forța oscilatorie critică pe domeniul de vâscoelasticitate.

În figura 4.4. tartinabilitatea atinge o valoare maximă de 63,09 Pa la sfârșitul domeniului de liniaritate.

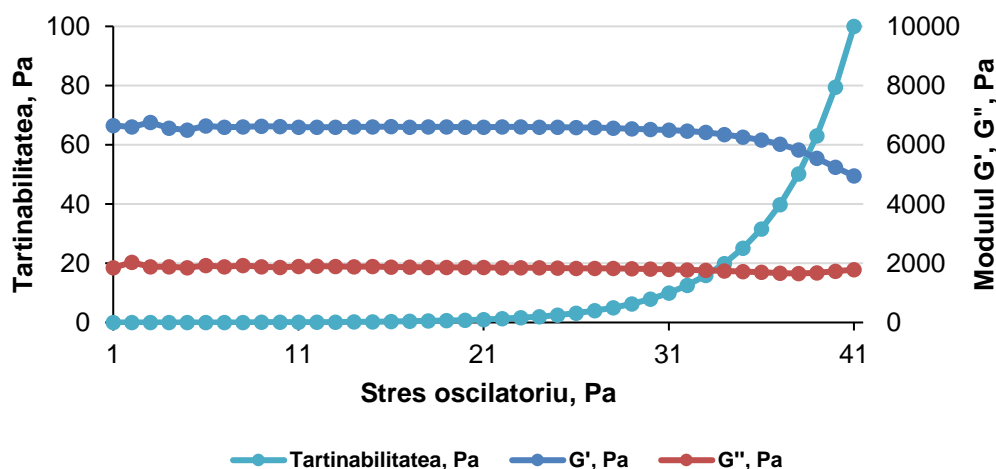


Figura 4.4. Tartinabilitatea exprimată ca "prag de curgere" pentru batonul vegetal în membrană de alginat de sodiu cu ingrediente bioactive încorporate.

Atât modulul elastic, cât și modulul vâscos au fost constante pe tot parcursul testului înregistrând valori mai reduse față de batonul vegetal în membrană de collagen.

Determinarea pH-ului

Din valorile înregistrate pentru determinarea pH-ului (tabelul 4.7), putem observa că acesta a scăzut nesemnificativ ($p > 0,05$), odată cu modificarea tipului de membrană pentru produsul vegetal tartinabil. De regulă membranele din alginat de sodiu sau alți polimeri incluși în matricea produsului înregistrează valori mai reduse ale pH-ului, datorită substanțelor utilizate la obținerea acestor sortimente de membrane.

4.5.3. Analiza microbiologică comparativă pentru un baton vegetal în membrană de alginat și membrană de collagen.

Rezultatele analizelor microbiologice ale celor două sortimente de baton vegetal umplut în membrane de alginat și baton vegetal umplut în membrană de collagen au fost prezentate în figura 4.5. (pentru drojzii și mucegaiuri) și figura 4.6. (pentru bacterii aerobe mezofile). În prima parte a intervalului de analiză, până în ziua 5, batonul ambalat în membrană de alginat a prezentat o valoare mai mare a ufc/ml, comparativ cu batonul ambalat în membrană de collagen. Proba CVB a avut un număr de 4×10^2 ufc/ml spre deosebire de proba CVC cu un număr de $1,8 \times 10^2$ ufc/ml. După ziua 5 de analiză numărul de ufc/ml a fost mai mare pentru CVC decât pentru CVB pe tot restul intervalului. Ținând cont de faptul că membrana activă pe bază de alginat a avut în compoziție extract de drojdie cu rol antioxidant și preparat fermentat pe bază de ceapă cu rol de conservant, acest lucru poate fi explicat prin prisma compușilor organici activi prezenți în membrana de alginat, compuși ce inhibă dezvoltarea de drojzii și mucegaiuri nedorite. Cu toate că dozajul inițial al acestor ingrediente a avut o valoare mică raportat la masa de gel aplicată pentru formarea membranei de alginat, acesta prezintă eficiență sporită pentru acest gen de aplicație.

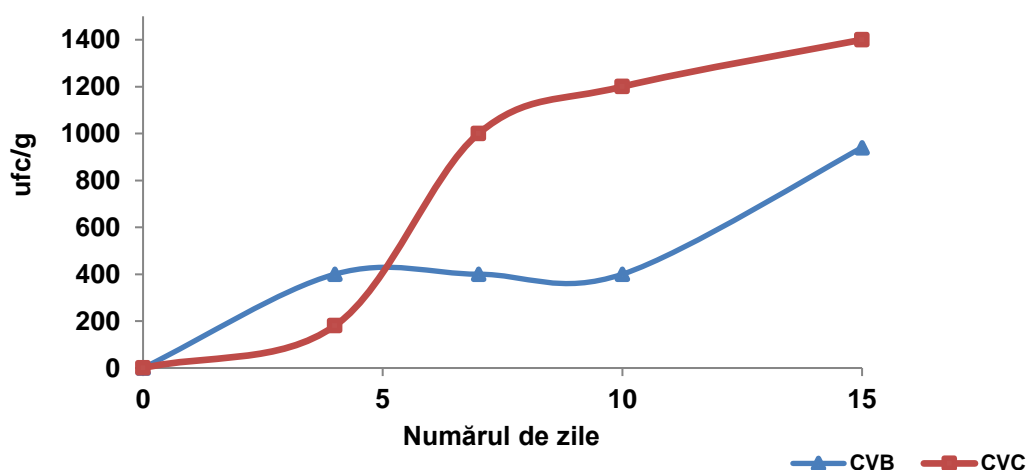


Figura 4.5. Determinarea numărului de drojzii și mucegaiuri pentru batonul vegetal în membrană de alginat și membrană de collagen într-un interval de 15 zile.

Conform [Mathenjwa et. al. \(2012\)](#), standardul acceptabil de calitate microbiană totală pentru cârnați proaspeți din carne este de 10^6 ufc/ml, iar pentru produse vegetale în membrană artificială de 10^3 ufc/g. S-au înregistrat unele diferențe de ordin zecimal în ziua a 7-a (4×10^2 ufc/ml pentru CVB și $1,0 \times 10^3$ ufc/ml pentru CVC), ziua a 10-a (4×10^2 ufc/ml pentru CVB și $1,2 \times 10^3$ ufc/ml pentru CVC) și în ziua a 15-a ($9,4 \times 10^2$ ufc/ml pentru CVB și respectiv $1,4 \times 10^3$ ufc/ml pentru CVC), diferențe ce au continuat până în ziua 17 a analizei.

Determinarea bacteriilor aerobe mezofile a fost ilustrată în Figura 4.6. pentru ambele produse ambalate în membrană de alginat și membrană de collagen. Aici s-a înregistrat o diferență clară a valorii reduse de bacterii ufc/ml pentru produsul ambalat în membrană de alginat. S-au înregistrat unele diferențe de ordin zecimal în ziua a 4-a ($5,0 \times 10^2$ ufc/ml pentru CVB și $1,5 \times 10^3$ ufc/ml pentru CVC) și în ziua a 7-a ($2,0 \times 10^3$ ufc/ml pentru CVB și $1,5 \times 10^4$ ufc/ml pentru CVC). După această referință situația a continuat în același mod până în ziua a 15-a cu valori ($1,7 \times 10^4$ ufc/ml atât pentru CVB, cât și pentru CVC).

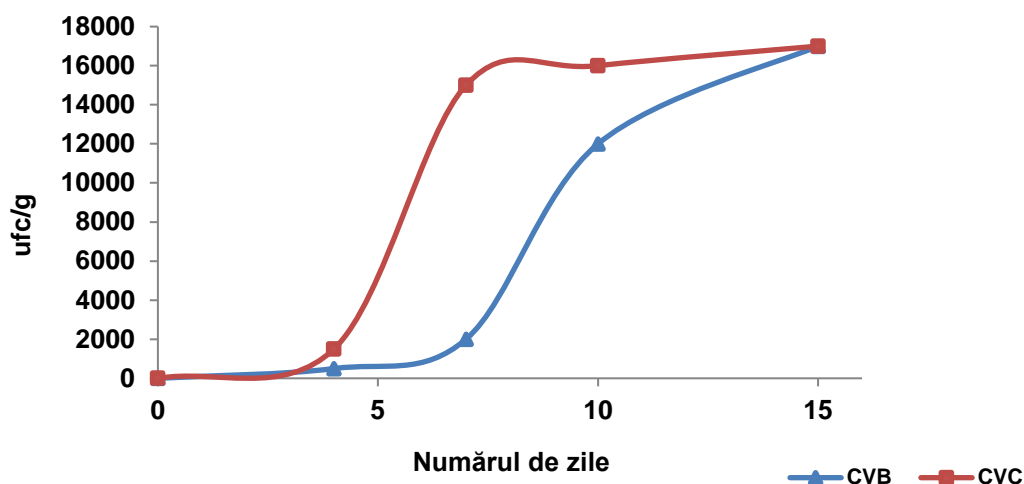


Figura 4.6. Determinarea numărului de bacterii aerobe mezofile pentru baton vegetal umplut în membrană de alginat și membrană de collagen într-un interval de 15 zile.

Raportat la standardele microbiologice pentru astfel de produse vegetale (SR EN ISO 2293:1988 și SR EN ISO 21527-1:2008) putem constata că variantele originale proiectate în acest studiu sunt conforme din punct de vedere microbiologic, au o perioadă de valabilitate destul de mare, chiar și după 15 de zile de conservare prin refrigerare, microbiota bacteriană fiind sub 5×10^4 ufc/ml. În plus, se constată absența coliformilor pe toată durata analizei.

4.5.4. Analiza senzorială- Testul scalar

Rezultatele analizei senzoriale au fost prezentate în figura 4.7., degustarea probelor având loc la jumătatea termenului de valabilitate al ambelor produse care au fost păstrate în condiții de refrigerare. Eșantioanele CVB au prezentat o structură mai omogenă și mai uniformă a pastei spre deosebire de eșantioanele CVC. La suprafață, membrana ambelor produse a fost netedă, întinsă și fără încrețituri. Culoarea și gustul au fost evaluate cu un scor mai scăzut pentru probele CVC decât CVB. Totuși, în secțiune culoarea a fost specifică materiei prime din care au fost obținute produsele, în cazul CVB ușor mai rozalie datorită adaosului de paprica din compoziție.

Gustul a fost specific materiei prime folosite (în acest caz năut și in) și potrivit ca nuanță de sărat și condimentat. Atât eșantioanele CVB, cât și eșantioanele CVC au prezentat o uniformitate constantă a pastei pe toată lungimea batonului. Un scor mai bun de 5,37 puncte a fost obținut de probele CVC pentru atributul *compactitate*, acestea fiind mult mai bine închegate, dense, fără particule libere față de proba CVB cu un punctaj de 3,62, lucru ce poate fi asociat și cu o tartinabilitate mai scăzută a acestei probe. *Mirosul* a fost specific de produs vegetal tratat termic pentru ambele probe datorită procesului tehnologic de pasteurizare la care acestea au fost supuse.

Observațiile echipei de degustători au indicat diferențe semnificative în ceea ce privește atributele de *aftertaste* și respectiv *gust de ingrediente străine*. Astfel, proba CVC a prezentat un gust remanent de soia, amar cu nuanțe de lapte și ou resimțite în timpul mestecării probei. La polul opus, probei CVB i-a fost asociat un gust remanent vegetal cu nuanțe de paprica și condimente resimțite în timpul mestecării probei.

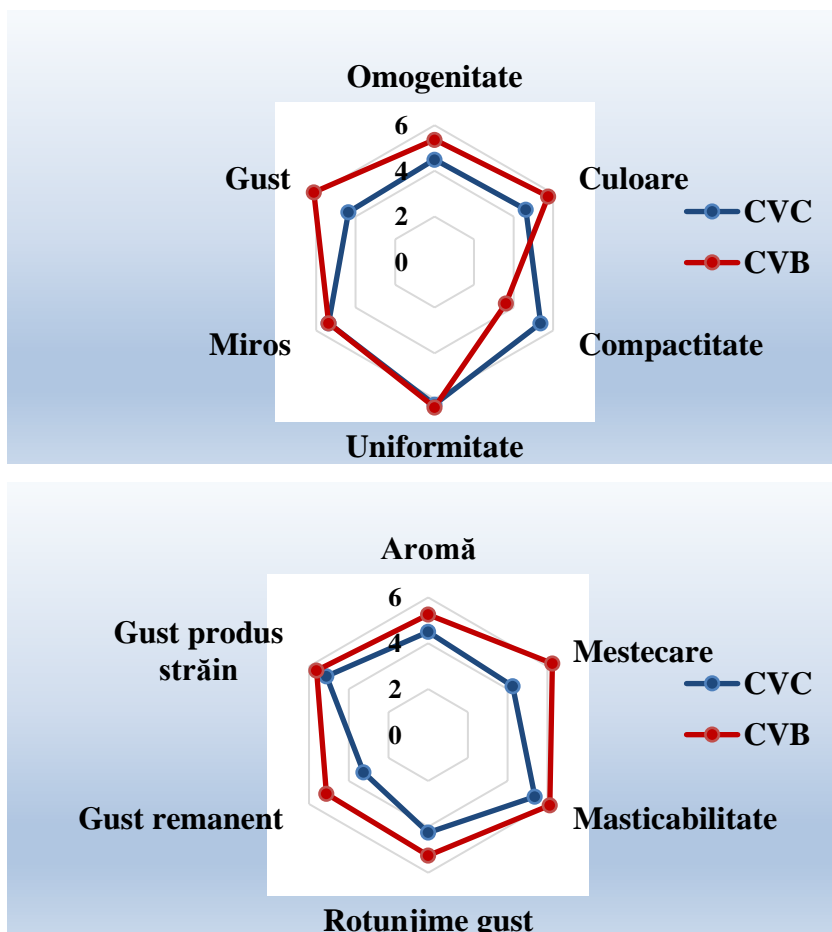


Figura 4.7. Atributele senzoriale medii ale probelor codificate CVC (baton vegetal cu membrană de colagen) și CVB (baton vegetal cu membrană de alginat)

În figura 4.8. a fost reprezentată impresia generală a echipei de degustători printr-un punctaj generalizat al tuturor atributelor senzoriale pentru probele CVC și CVB. Ca scor total, proba CVB a înregistrat un punctaj mediu de 5,52 și o valoare uniformă superioară pentru 9 atribute senzoriale spre deosebire de proba din comerț, CVC, care a înregistrat un punctaj mediu de 4,77 și o valoare superioară pentru doar două atribute senzoriale.

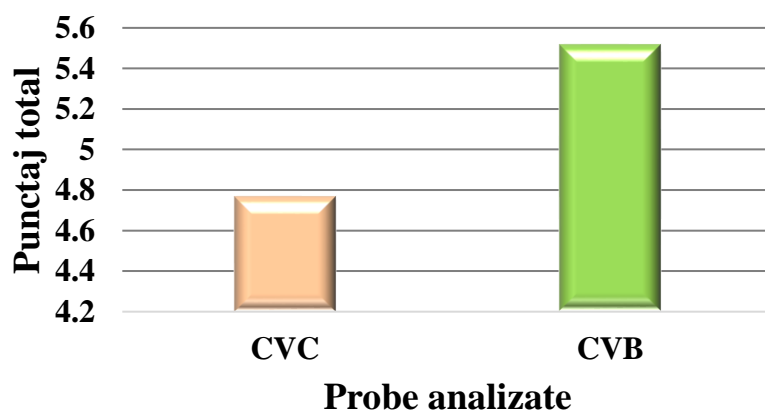


Figura 4.8. Impresia generală a echipei de degustători pentru probele CVC și CVB.

4.5.5. Analiza SWOT a batonului vegetal în membrană de alginat de sodiu

a. Puncte Tari

- Eficiență și control a materiei prime vegetale utilizate atât pentru obținerea compoziției produsului, cât și pentru obținerea membranei vegetale,
- Obținerea unui produs vegetal tip Frankfurter cu caracteristici organoleptice și senzoriale similare celor din carne,
- Ambalare în tăvițe din plastic sub atmosferă modificată care permit o perioadă mai lungă de valabilitate, transport și manipulare facilă,
- Costuri reduse și calitate constantă a membranelor pe bază de alginat spre deosebire de membranele naturale.

b. Puncte Slabe

- Utilajele necesare formării membranelor pe bază de alginat au costuri mari și greu de amortizat (Două mașini de umplut sincronizate între ele de la Vemag sau Handmann),
- Necesitatea unei atenții sporite la setările mașinilor de umplut/format pentru gelul de hidrocoloizi necesar la obținerea acestor membrane.

c. Oportunități

- Produse noi/inovatoare care urmăresc o anumită nișă de consumatori interesați de produse exclusiv vegetale,
- Versatilitate în producție, aceste membrane fiind utilizate atât pentru Crenvurști, cât și pentru salamuri crud uscate sau produse vegetale diverse,
- Produse momentan neexploatate la adevăratul potențial.

d. Amenințări

- Prezența aditivilor pe eticheta produsului (alginatul de sodiu este etichetat ca număr E conform legislației Europene în vigoare),
- Reticența consumatorilor la tipul de membrane vegetale.

4.6. Concluzii parțiale

- Datorită compoziției pe bază de proteine vegetale utilizate, modificările de culoare au fost ne semnificative ($p > 0,05$) pentru membranele pe bază de alginat de sodiu și membranele pe bază de collagen.
- În ceea ce privește tartinabilitatea produselor, exprimată ca "prag de curgere", s-au obținut diferențe statistic semnificative ($p < 0,05$), datorită grosimii și permeabilității vaporilor de apă diferite înregistrate între probele analizate. Astfel, tartinabilitatea pentru produsul vegetal în membrană de collagen atinge o valoare maximă de 79,43 Pa, spre deosebire de tartinabilitatea produsului vegetal în membrană de alginat ce atinge o tartinabilitate de doar 63,05 Pa (tabelul 4.7.), fiind mai moale, mai inconsistent decât proba în membrană de collagen.
- Diferența de pH între probele analizate relevă o valoare statistică ne semnificativă ($p > 0,05$) între cele două produse.
- În cazul analizei microbiologice pentru determinarea drojdiilor și mucegaiurilor, în cazul ambelor tipuri de membrane s-au înregistrat unele diferențe de ordin zecimal în ziua a 7-a (4×10^2 ufc/ml pentru probele CVB și $1,0 \times 10^3$ ufc/ml pentru probele CVC), ziua a 10-a ($4,0 \times 10^2$ ufc/ml pentru CVB și $1,2 \times 10^3$ ufc/ml pentru CVC) și în ziua a 15-a ($9,4 \times 10^2$ ufc/ml pentru CVB și respectiv $1,4 \times 10^3$ ufc/ml pentru CVC). În cazul analizei microbiologice pentru

determinarea bacteriilor aerobe mezofile s-au înregistrat unele diferențe de ordin zecimal în ziua a 4-a ($5,0 \times 10^2$ ufc/ml pentru CVB și $1,5 \times 10^3$ ufc/ml pentru CVC) și în ziua a 7-a ($2,0 \times 10^3$ ufc/ml pentru CVB și $1,5 \times 10^4$ ufc/ml pentru CVC). După această referință, situația a continuat în aceeași tendință până în ziua a 15-a ($1,7 \times 10^4$ ufc/ml atât pentru CVB, cât și pentru CVC). În plus, nu a fost observat un impact nedorit asupra factorilor de calitate ai produselor vegetale la sfârșitul celor 15 zile de valabilitate.

- Sensorial, impresia generală a echipei de degustători a notat printr-un punctaj generalizat un scor total pentru proba CVB de 5,52 puncte și o valoare uniformă superioară pentru 9 atribute senzoriale (omogenitate, culoare, uniformitate, gust, aromă, mestecare, rotunjime gust, gust remanent, gust produs străin). Pentru proba CVC s-a înregistrat un scor total de 4,77 puncte și o valoare superioară pentru doar două atribute senzoriale (compactitate și miros).
- Analiza SWOT a concluzionat o serie de avantaje și dezavantaje specifice produselor vegetale în membrană de alginat de sodiu.

V. Concluzii generale, perspective și contribuții personale

Concluzii generale

Cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat au vizat obținerea unui film bioedibil cu ingrediente bioactive încorporate. În experiment au fost selectați patru hidrocoloizi, respectiv alginat de sodiu, carboximetil celuloză, carrageenan și gumă Konjac.

○ Caracterizarea reologică a fiecărui hidrocoloizid luat în studiu, în vederea stabilirii compoziției optime a filmului a scos în evidență următoarele aspecte:

- Din punct de vedere reologic amestecul optim de hidrocoloizi pentru obținerea unui film bioedibil funcțional este reprezentat de combinația între alginatul de sodiu, carboximetil celuloză și guma Konjac. Un astfel de film bioedibil funcțional asigură rezistență mecanică sporită, o valoare redusă a permeabilității vaporilor de apă, grosime și culoare uniformă și totodată reprezintă o matrice suport ideală pentru încorporarea elementelor bioactive precum extractul de drojdie, preparatul fermentat pe bază de ceapă și tulpina probiotică de *Bacillus subtilis* CU1.

○ În vederea formulării rețetei pentru obținerea filmelor bioedibile cu ingrediente bioactive încorporate au fost analizate mai multe combinații ale hidrocoloizilor selectați în studiu, respectiv AL+CMC, AL+CMC+KG, AL+CMC+RC+KG, la care s-au adăugat ingredientele bioactive preparat fermentat pe bază de ceapă, extract de drojdie și o tulpină probiotică de *Bacillus subtilis* CU1.

○ Viabilitatea și aplicabilitatea tulpinii de *B. subtilis* CU1 (CNCM I-2745), un probiotic destinat pentru consum uman (Anexa 2-Food grade certificate. Probisis BS), a fost evaluată prin efectuarea unor serii de teste/analize microbiologice ce presupun încorporarea acestei tulpini în matricea filmelor bioedibile funcționale.

○ Analiza microbiologică a filmelor pe bază de alginat a arătat faptul că, atât în cazul determinărilor efectuate pentru ingredientele active individual, cât și în cazul determinărilor realizate pentru filmele pe bază de alginat care înglobează aceste ingrediente bioactive, viabilitatea culturii de *B. subtilis* CU1 au avut valori mai mari de 10^8 ufc/g după intervalul de timp stabilit. În cazul ingredientelor bioactive individuale, proba P2 (*Bacillus subtilis* CU1 + extract de drojdie) a avut o viabilitate de $4,15 \times 10^8$ ufc/g, ceea ce reprezintă un rezultat de luat în considerare pe parcursul celor 8 zile de studiu.

○ În cazul filmelor pe bază de alginat cu ingrediente bioactive încorporate se remarcă formula 2, adică AL+CMC+RC+KG și amestecul de (*Bacillus subtilis* CU1 + extract de drojdie + preparat fermentat pe bază de ceapă), care reprezintă varianta cu cel mai bun rezultat din punct de vedere al viabilității microorganismului, atingându-se un număr de $1,8 \times 10^9$ ufc/g la sfârșitul studiului.

○ Experimentele efectuate pentru determinarea caracteristicilor reologice, a culorii, grosimii, permeabilității vaporilor de apă pentru filmele pe bază de alginat de sodiu:

- Caracteristicile reologice ale filmelor obținute utilizând amestecurile AL+CMC și AL+CMC+KG au fost comparabile, ca o consecință a utilizării de amestecuri similare de hidrocoloizi în formula de obținere a filmelor. Filmul compozit obținut a prezentat proprietăți elastice notabile și o rezistență sporită. Formula optimă, din punct de vedere al comportamentului reologic, are la bază următoarea formulă: 5%AL+0,5%CMC+0,5%KG și poate deservi drept matrice suport pentru diferitele ingrediente bioactive care vor fi încorporate în formula finală.

- În cazul analizei de determinare a culorii și grosimii filmelor pe bază de alginat de sodiu adaosul unei cantități mari de acid oleic, extract de drojdie și preparat fermentat pe bază de ceapă a determinat o modificare a culorii de la galben deschis la alb-gălbui pentru probele 2A

(ac. oleic 0,925g, glicerol 0,925g, PFC 1g și ED 1g) și 2B (ac. oleic 1,025g, glicerol 1,025g, PFC 1,25g și ED 1,25g), la care valoarea lui a^* scade de la -1,58 la -1,60 iar grosimea celor două filme se încadrează în jurul valorii de 0,13 mm. Pentru filmele în care s-au adăugat doar glicerol, extract de drojdie și preparat fermentat pe bază de ceapă, culoarea s-a intensificat spre galben închis odată cu creșterea graduală a dozajului de substanțe bioactive.

- WVP și WVTR pentru filmele bioedibile pe bază de alginat de sodiu au fost evaluate în funcție de concentrația soluției, grosimea filmelor și tipul de plasticizant adăugat pentru îmbunătățirea proprietăților acestor filme. În cazul Metodei cupelor cu sicativ, experimentul a arătat faptul că WVP a avut cele mai bune valori localizate în intervalul 11,11 g mm/kPa zi m^2 și 12,72 g mm/kPa zi m^2 , adică la grosimi situate între 0,13-0,15 mm și temperatura de 8°C, la care raportul între plasticizanții glicerol: acid oleic adăugați în compoziția filmului a fost de 1:1. Astfel, filmele realizate din amestecul hidrocoloizilor reprezentați de proba P4a și respectiv P5a au fost filmele optime pentru acoperirea și protecția împotriva vaporilor de apă a unui produs alimentar. În cazul Metodei cupelor cu apă distilată, WVP a avut cele mai bune valori localizate în intervalul -8,06 g mm/kPa zi m^2 și -13,31 g mm/kPa zi m^2 , adică la grosimi situate în jurul valorii de 0,13mm și 0,15 mm și temperatura de 8°C.

- Analiza experimentală. Optimizarea compoziției amestecului filmului bioedibil a fost realizată cu ajutorul unui model experimental, care a ajutat în acordarea fină a unor parametri cheie în ceea ce privește componentele analizate și răspunsurile acestora. Proiectarea experimentală a permis analiza interacțiunilor dintre toate componentele, respectând proporțiile și proprietățile dorite ale materialului, astfel încât formularea unei rețete să fie îmbunătățită înainte de testele preliminare, eliminând cât mai mult eroarea. Conform predicțiilor oferite de modelul experimental se poate spune că cea mai apropiată versiune, ușor optimizabilă către ipoteza ideală, este oferită de proba P5a cu parametrii: raportul glicerol: acid oleic de 0,9:0,9, temperatura optimă de 8°C, grosimea filmului de 0,15 mm, WVTR = 11,31 g / zi m^2 și WVP = 12,72 g mm/kPa zi m^2 .

○ În cazul analizei microbiologice pentru determinarea drojdiilor și mucegaiurilor pentru ambele tipuri de membrane s-au înregistrat unele diferențe de ordin zecimal; în ziua a 7-a 4×10^2 ufc/ml pentru probele CVB (baton vegetal în membrană de alginat) și $1,0 \times 10^3$ ufc/ml pentru probele CVC (baton vegetal în membrană de colagen), ziua a 10-a (4×10^2 ufc/ml pentru CVB și $1,2 \times 10^3$ ufc/ml pentru CVC) și în ziua a 15-a ($9,4 \times 10^2$ ufc/ml pentru CVB și respectiv $1,4 \times 10^3$ ufc/ml pentru CVC). În cazul analizei microbiologice pentru determinarea bacteriilor aerobe mezofile s-au înregistrat unele diferențe de ordin zecimal în ziua a 4-a ($5,0 \times 10^2$ ufc/ml pentru CVB și $1,5 \times 10^3$ ufc/ml pentru CVC) și în ziua a 7-a ($2,0 \times 10^3$ ufc/ml pentru CVB și $1,5 \times 10^4$ ufc/ml pentru CVC). După această referință situația s-a menținut constantă ca ufc/g în ziua a 15-a înregistrându-se un număr de $1,7 \times 10^4$ ufc/ml atât pentru proba CVB cât și pentru proba CVC). În plus, nu a fost observat un impact nedorit asupra factorilor de calitate ai produselor vegetale alternative la sfârșitul celor 15 zile de valabilitate.

○ Din punct de vedere senzorial, punctajul acordat pentru impresia generală (5,52 puncte) de către echipa de degustători pentru proba CVB indică o valoare superioară pentru 9 atribute senzoriale (omogenitate, culoare, uniformitate, gust, aromă, mestecare, rotunjime gust, gust remanent, gust produs străin). Pentru proba CVC s-a înregistrat un scor total de 4,77 puncte și o valoare superioară pentru doar două atribute senzoriale (compactitate și miros).

Perspective de continuare a cercetărilor

În urma realizării studiului de față au rezultat următoarele perspectivele de continuare a cercetărilor:

- Aplicarea filmelor funcționale bioedibile cu ingrediente bioactive încorporate pe un produs finit de tipul baton vegetal tip Frankfurter în sistem industrial și comercializarea acestuia la nivel local, regional sau la nivel de țară.
- Studierea comportamentului unui astfel de film funcțional bioedibil și pe alte sortimente de produse vegetale precum baton vegetal proaspăt, fantezie vegetală, etc.
- Promovarea și evidențierea caracteristicilor acestor sortimente de filme bioedibile din punct de vedere al sustenabilității materiilor prime din care sunt obținute.
- Studiul și diversificarea tipului de hidrocoloizi care pot fi integrați într-un astfel de amestec în vederea obținerii unor filme bioedibile superioare.

Contribuții personale și realizări științifice

Originalitatea prezentului studiu constă în următoarele:

- Studierea individuală, amănunțită, a principalilor tipuri de hidrocoloizi (alginat de sodiu, carboximetil celuloză, Kappa-carrageenan și gumă Konjac) actual utilizați la obținerea filmelor funcționale bioedibile din punct de vedere al caracteristicilor tehnologice și reologice a acestora.
- Studierea individuală amănunțită a principalilor compuși bioactivi (preparat fermentat pe bază de ceapă, extract de drojdie și *Bacillus subtilis* CU1) care pot fi utilizați la încorporarea în matricea filmelor funcționale bioedibile pe bază de alginat de sodiu.
- Studierea comportamentului fizico-chimic, tehnologic și reologic a filmelor funcționale bioedibile pe bază de alginat de sodiu cu ingrediente bioactive încorporate.
- Obținerea prin metode tehnologice a unui baton vegetal alternativ în membrană de alginat de sodiu cu compuși bioactivi încorporați.
- Studiul microbiologic de validare și verificare a termenului de valabilitate din punct de vedere al dezvoltării și multiplicării numărului de microorganisme pentru batonul vegetal în membrană de alginat de sodiu cu ingrediente bioactive încorporate pe o perioadă de 15 de zile, la temperatura de 8°C.
- Proiectarea experimentală a filmelor pe bază de alginat de sodiu în vederea obținerii unui înveliș flexibil, mediu ca grosime, cu o permeabilitate redusă a vaporilor de apă și cu proprietăți reologice similare membranelor artificiale.

Diseminarea rezultatelor cercetării

Rezultatele cercetărilor derulate în perioada studiilor doctorale au fost diseminate prin publicare de articole reprezentative pentru domeniul abordat și comunicări la manifestări științifice naționale și internaționale.

A. Articole publicate în jurnale indexate în Web of Science Core Collection

1. Ina Vasilean, Iuliana Aprodu, Marian Neculau, Livia Patrașcu. 2018. *Effect of pulsed light treatment on germination efficiency of pulses*. Scientific Papers-Series D-Animal Science, LXI(1), 266-274.

B. Articole publicate în jurnale indexate BDI

1. Marian Neculau, Vasilica Barbu, Giorgiana-Valentina Costea, Livia Pătrașcu, Camelia Vizireanu, *Microbiological analysis and the antioxidant capacity of edible biofilms enclosing Bacillus subtilis*, publicat în *Lucrări științifice, seria Agronomie*, (2016), Vol. 59, nr. 2, USAMV Iași

C. Abstracte publicate în jurnale cotate ISI

1. Marian Neculau, Mihaela Alina Ceoromilă, Valentina Giorgiana Blaga (Costea), Gabriel Mustățea, Camelia Vizireanu, *Structural and physicochemical properties of emulsified alginate-based film coatings for food products*, Conferința Internațională „European Biotechnology Congress”, Dubrovnik, Croația, *Journal of Biotechnology*, 256S (2017) S44–S116.

2. Giorgiana-Valentina Blaga (Costea), Marian Neculau, Livia Pătrașcu, Camelia Vizireanu, A comparison between low amplitude oscillatory shear and forced flow in determining honey rheological behavior, Conferința Internațională „European Biotechnology Congress”, Dubrovnik, Croația, Journal of Biotechnology, 256S (2017) S44–S116.

D. Abstracte publicate în volume conferințelor internaționale

1. Marian Neculau, Iuliana Aprodu, Daniela Borda, Livia Pătrașcu, Camelia Vizireanu, *Physicochemical, rheological and experimental study of different biopolymers for obtaining functional edible films and coatings*, 3-rd International Conference on Bio-based Polymers and Composites, BiPoCo, Szeged, Hungary, (2016), P37.

E. Comunicări la manifestări științifice internaționale

1. Ina Vasilean, Iuliana Aprodu, Marian Neculau, Livia Pătrașcu, *Effects of pulse light treatment on germination efficiency of pulses*. The international conference: Agriculture for life, life for agriculture, USAMV București, Romania, 2018.
2. Ina Vasilean, Iuliana Aprodu, Marian Neculau, Livia Pătrașcu. *The effect of physical pre-germination treatments on nutritional functionality of pulses*. Bioavailability 2018 - Understanding the bioavailability of micronutrients and bioactive compounds for improved public health, September 10-13, 2018, Norwich, UK.
3. Ina Vasilean, Iuliana Aprodu, Marian Neculau, Livia Pătrașcu. *Germination as a tool for enhancing the nutritional value of pulses*. The 8th International Symposium EuroAliment – *Mutatis mutandis* in Food, 7-8 September 2017, Galați, Romania.

F. Comunicări la manifestări științifice naționale

1. Marian Neculau, Camelia Vizireanu, Iuliana Aprodu, *A biotechnological study of raw materials used for obtaining edible biofilms*, Scientific conference of Doctoral Schools from University „Dunărea de Jos”, Third edition, Galați, România, 2015.
2. Marian Neculau, Alina Ceoromilă, Livia Pătrașcu, Camelia Vizireanu, *Biocompatibility of different hydrocolloids for obtaining edible films and coatings as packaging material*. Conferința școlilor doctorale, Galați, România, 2017
3. Marian Neculau, Iuliana Aprodu, Daniela Borda, Vasilica Barbu, Camelia Vizireanu, *Edible films: technical, technological aspects and analytical methods for their characterization (Antioxidant and Microbiological aspects)*. Doctoral Schools from University „Dunărea de Jos”, Third edition, Galați, Romania, 2018

G. Activități adiacente

1. Ecotrophelia Europe:

- a. Participare Ecotrophelia Europe 2017, Galați, Faza Locală, 20 Mai 2017
Premiul I--- Produsul HiProBar: Marian Neculau, Cristian Dragomir, Ramona Ifrim.
- b. Participare Ecotrophelia Europe 2017, Suceava, Faza Națională, 3-4 Iulie 2017
Premiul I---Produsul HiProBar: Marian Neculau, Cristian Dragomir, Ramona Ifrim.
- c. Participare Ecotrophelia Europe 2017, Londra, Faza Internațională, 22-24 Noiembrie 2017: Marian Neculau, Cristian Dragomir, Ramona Ifrim.

2. Participarea la activități adiacente de cercetare în cadrul universității:

- a. Brevet de invenție: Produs vegetal tartinabil și procedeul de obținere al acestuia. Aprobabil 30.06.2016. Inventatori: Livia Pătrașcu, Iuliana Aprodu, Ina Vasilean, Marian Neculau. Acceptat cu nr. PN-III-P1-1.1-PREC-BVT-2018-1205.
- b. Contract de cercetare nr. 173PED/2017, cod PNIII-P2-2.1-PED-2016-0155, cu titlul Dezvoltarea de noi produse funcționale pe bază de leguminoase germinate, acronim ProPulse.
- c. Participare la Bursa Națională a Invențiilor Românești: Conceput în România
- d. Diplomă de participare de la Ministerul Invențiilor pentru produsul brevetat la Geneva: *Spreadable vegetable product and the process for obtaining the same*. Livia Pătrașcu, Iuliana Aprodu, Ina Vasilean, Marian Neculau. 20 Iunie 2017.