

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Științe fundamentale și ingineresti



TEZĂ DE DOCTORAT

**Compozite funcționale pe bază de proteine din zer și
extracte vegetale din fructe roșii**

(Rezumatul tezei de doctorat)

Doctorand,
Ana Maria OANCEA

Conducător științific,
Prof.univ.dr.ing Gabriela Elena BAHRIM

Seria I.1: BIOTEHNOLOGII Nr. 12

GALAȚI
2020

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Științe fundamentale și ingineresti



TEZĂ DE DOCTORAT

**Compozite funcționale pe bază de proteine din zer și
extracte vegetale din fructe roșii**

(Rezumatul tezei de doctorat)

**Doctorand,
Ana Maria Oancea**

Conducător științific

Prof.univ.dr.ing Gabriela Elena BHRIM

Referenți științifici

Prof.univ.dr.biochim. Simona Rodica OANCEA

Prof.univ.dr.ing. Mircea-Adrian OROIAN

Prof.univ.dr.ing. Nicoleta STĂNCIUC

Seria I.1: BIOTEHNOLOGII Nr. 12

GALAȚI

2020

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

Domeniul **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**

Domeniul **ȘTIINȚE ECONOMICE**

Seria E 1: **Economie**

Seria E 2: **Management**

Domeniul **ȘTIINȚE UMANISTE**

Seria U 1: **Filologie- Engleză**

Seria U 2: **Filologie- Română**

Seria U 3: **Istorie**

Cuprins

| | |
|--|-----------|
| Introducere | 1 |
| I. STUDIUL DOCUMENTAR | 13 |
| <i>Tendențe moderne privind studiul și valorificarea compușilor bioactivi din fructe roșii autohtone</i> | <i>13</i> |
| Capitolul 1. Structura, clasificarea și biodisponibilitatea compușilor polifenolici..... | 14 |
| 1.1.Compuși polifenolici vegetali: clasificare și structură | 14 |
| 1.2.Biodisponibilitatea polifenolilor | 15 |
| Capitolul 2. Vișinele – surse importante de compuși biologic activi..... | 16 |
| 2.1.Introducere | 16 |
| 2.2.Caracterizarea morfologică și compozițională a vișinelor (<i>Prunus cerasus</i> L.)..... | 17 |
| 2.2.1.Descrierea botanică a vișinelor | 17 |
| 2.2.2.Componente bioactive din vișine | 18 |
| 2.2.3.Proprietățile bioactive ale vișinelor..... | 21 |
| Capitolul 3. Caracterizarea morfologică și compozițională a fructelor de soc, soiul <i>Sambucus nigra</i> L..... | 24 |
| 3.1.Descrierea botanică a socului | 24 |
| 3.2.Compoziția fitochimică a fructelor de soc..... | 24 |
| 3.3.Proprietățile bioactive ale fructelor de soc..... | 28 |
| 3.4.Farmacocinetica și mecanismele de acțiune a compușilor din fructelor de soc | 32 |
| Capitolul 4. Proteinele din zer, matrici pentru obținerea de ingrediente funcționalizate îmbogățite în compuși polifenolici..... | 33 |
| 4.1. Aspecte generale..... | 33 |
| 4.2. β -Lactoglobulina din zer | 33 |
| 4.2.1.Structura primară..... | 33 |
| 4.2.2.Structura secundară | 33 |
| 4.2.3.Flexibilitatea conformațională..... | 34 |
| Referințe bibliografice | 35 |
| II. STUDIUL EXPERIMENTAL..... | 40 |
| Capitolul 5. Studiul și valorificarea potențialului bioactiv al compușilor fenolici din vișine (<i>Prunus cerasus</i> L.)..... | 41 |
| 5.1. Caracterizarea fitochimică și cinetica de degradare termică a compușilor bioactivi din extractele din pieliță de vișine (<i>Prunus cerasus</i> L.) | 41 |
| 5.1.1. Aspecte generale | 41 |
| 5.1.2. Materiale și metode | 41 |
| Reactivi utilizați..... | 41 |
| Extracția polifenolilor din pielița de vișine | 41 |
| Determinarea conținutului de antociani monomerici | 42 |
| Determinarea conținutului de flavonoide totale | 44 |
| Determinarea conținutului de polifenoli totali..... | 44 |
| Determinarea activității antioxidante | 45 |
| Tratamentul termic..... | 46 |
| Analiza cromatografică a antocianilor din extractele din pieliță de vișine | 47 |
| Cinetica de degradare termică a compușilor polifenolici din extractele din pieliță de vișine..... | 48 |
| Analiza statistică..... | 49 |
| 5.1.3. Rezultate și discuții..... | 49 |
| Caracterizarea profilului fitochimic al extractului din pieliță de vișine..... | 49 |
| Influența tratamentului termic asupra intensității fluorescenței și a profilului fitochimic al extractului din pieliță de vișine..... | 51 |
| Cinetica de degradare termică a compușilor bioactivi din extractul de vișine | 55 |
| 5.1.4. Concluzii parțiale | 58 |
| Referințe bibliografice | 59 |
| 5.2. Evaluarea mecanismelor de legare a antocianilor din extractul de vișine de β -lactoglobulină..... | 63 |
| 5.2.1. Aspecte generale | 63 |

Compozite funcționale pe bază de proteine din zer și extracte vegetale din fructe roșii

| | |
|---|------------|
| 5.2.2. Materiale și metode | 64 |
| Extracția polifenolilor din extractul din pielița de vișine | 64 |
| Analiza fitochimică a extractului etanolic din pielița de vișine | 64 |
| Prepararea complexului format dintre β -lactoglobulină și extractul antocianic din vișine..... | 64 |
| Influența tratamentului termic asupra complexului format..... | 64 |
| Analiza spectrofluorimetrică a extractului din pielița de vișine | 64 |
| Analiza spectrofluorimetrică a complexului format dintre β -lactoglobulină și extractul antocianic din vișine..... | 65 |
| Investigații in silico privind interacțiunea β -lactoglobulinei și a cianidin-3-rutinozid | 65 |
| 5.2.3. Rezultate și discuții..... | 66 |
| Studii de quenching privind β -lactoglobulina tratată termic și extractul antocianic din vișine. | 66 |
| Interacțiunea in silico dintre cianidin-rutinozid și molecula de β -lactoglobulină | 70 |
| Influența intensității fluorescenței asupra complexului β -lactoglobulină-extract antocianic din pielița de vișine..... | 72 |
| Fluorescența extrinsecă a complexului β -LG-EAV..... | 74 |
| Diagrama de faze | 74 |
| Spectrele sincron ale complexului β -LG-EAV | 76 |
| Spectroscopia de fluorescență tridimensională..... | 76 |
| Experimente de quenching..... | 77 |
| 5.2.4. Concluzii parțiale | 78 |
| Referințe bibliografice..... | 80 |
| 5.3. Ingrediente funcționale obținute prin microîncapsularea antocianilor din extractul de vișine utilizând proteinele din zer drept matrice de încapsulare | 84 |
| 5.3.1. Aspecte generale | 84 |
| 5.3.2. Materiale și metode | 85 |
| Reactivi..... | 85 |
| Extracția compușilor polifenolici din vișine | 85 |
| Determinarea conținutului de antociani monomerici (CAM)..... | 85 |
| Obținerea microcapsulelor..... | 86 |
| Eficiența încapsulării..... | 86 |
| Studii colorimetrice | 87 |
| Activitatea antioxidantă a microcapsulelor | 87 |
| Microscopie confocală pentru analiza microcapsulelor | 87 |
| Analiza FT-IR..... | 88 |
| Digestibilitatea in vitro..... | 88 |
| Analiza statistică..... | 88 |
| 5.3.3. Rezultate și discuții..... | 88 |
| Caracterizarea fitochimică a extractului etanolic din pielița de vișine | 88 |
| Evaluarea eficienței încapsulării polifenolilor..... | 89 |
| Caracterizarea eficienței încapsulării antocianilor în matricea proteică | 90 |
| Analiza FT-IR a compușilor biologic activi din extract și microparticule..... | 90 |
| Evaluarea structurii și morfologiei microparticulelor | 91 |
| Analiza morfologică a microcapsulelor | 92 |
| Studiul parametrilor de culoare ai extractului și a microparticulelor | 93 |
| Studiul parametrilor de culoare a microcapsulelor | 94 |
| Activitatea antioxidantă a microparticulelor | 94 |
| Digestibilitatea in vitro a compușilor bioactivi microîncapsulați..... | 94 |
| Digestibilitatea in vitro a microcapsulelor | 95 |
| 5.3.4. Concluzii parțiale | 95 |
| Referințe bibliografice..... | 97 |
| Capitolul 6. Studiul și valorificarea compușilor biologic activi din fructe de soc (<i>Sambucus nigra</i>) | 100 |

Compozite funcționale pe bază de proteine din zer și extracte vegetale din fructe roșii

| | |
|---|-----|
| 6.1. Caracterizarea fitochimică și cinetica de degradare termică a compușilor bioactivi din extractele din fructele de soc (<i>Sambucus nigra</i> L.)..... | 100 |
| 6.1.1. Aspecte generale | 100 |
| 6.1.2. Materiale și metode | 100 |
| Extracția polifenolilor din fructele de soc | 101 |
| Determinarea conținutului de antociani monomerici | 101 |
| Determinarea conținutului de polifenoli totali..... | 101 |
| Determinarea activității antioxidante | 101 |
| Tratamentul termic..... | 101 |
| Determinarea spectrelor de emisie cu ajutorul spectroscopiei de fluorescență..... | 101 |
| Analiza cromatografică a antocianilor din extractele din fructe de soc | 101 |
| Cinetica de degradare termică a compușilor polifenolici din extractele de fructe de soc..... | 101 |
| Analiza statistică | 102 |
| 6.1.3. Rezultate și discuții..... | 102 |
| Profilul fitochimic al extractelor din fructele de soc (<i>Sambucus nigra</i> L.) | 102 |
| Influența tratamentului termic asupra intensității fluorescenței extractului din fructe de soc..... | 104 |
| Influența tratamentului termic asupra compușilor bioactivi din extractul din fructe de soc și asupra activității antioxidante | 106 |
| Cinetica de degradare termică a compușilor bioactivi din extractul din fructe de soc..... | 109 |
| 6.1.4. Concluzii..... | 112 |
| Referințe bibliografice | 113 |
| 6.2. Evaluarea mecanismelor de legare dintre compușii bioactivi din fructele de soc și proteinele din zer | 117 |
| 6.2.1. Aspecte generale | 117 |
| 6.2.2. Materiale și metode | 117 |
| Reactivi..... | 117 |
| Extracția și caracterizarea compușilor bioactivi din fructele de soc | 118 |
| Tratamentul termic..... | 118 |
| Experimentele de quenching între izolatul proteic din zer și extractul de soc..... | 118 |
| Studii spectrofluorimetrice pentru analiza proprietăților de legare ale extractului din fructe de soc și izolat proteic din zer..... | 119 |
| Studii de andocare moleculară a mecanismului de legare dintre β -lactoglobulină și principalul antocian și flavonoid din extractul de fructe de soc | 119 |
| Analiza statistică | 119 |
| 6.2.3. Rezultate și discuții..... | 119 |
| Caracterizarea fitochimică a extractului etanolic din fructe de soc | 119 |
| Analiza proprietăților de legare ale extractului din fructe de soc cu proteinele din zer..... | 120 |
| Investigații la nivel molecular ale mecanismului de legare dintre β -LG și moleculele de antociani și flavonoide din extractul din soc | 124 |
| 6.2.4. Concluzii..... | 125 |
| Referințe bibliografice | 126 |
| 6.3. Investigații privind microîncapsularea compușilor bioactivi din fructele de soc (<i>Sambucus nigra</i> L.) utilizând proteinele din zer ca matrice | 127 |
| 6.3.1. Aspecte generale | 127 |
| 6.3.2. Materiale și metode | 127 |
| Reactivi..... | 127 |
| Extracția compușilor bioactivi din fructele de soc..... | 128 |
| Microîncapsularea compușilor bioactivi din soc | 128 |
| Evaluarea eficienței de încapsulare a antocianilor..... | 128 |
| Caracterizarea fitochimică a microcapsulelor..... | 128 |
| Studiul culorii microcapsulelor | 128 |
| Tratamentul termic..... | 128 |
| Evaluarea morfologică a microcapsulelor utilizând microscopia confocală | 129 |
| Studii de degradare termică | 129 |

Compozite funcționale pe bază de proteine din zer și extracte vegetale din fructe roșii

| | |
|---|------------|
| Analiza statistică..... | 129 |
| 6.3.3. Rezultate și discuții..... | 129 |
| Conținutul de compuși bioactivi și activitatea antioxidantă a microcapsulelor | 129 |
| Eficiența încapsulării..... | 129 |
| Structura morfologică a microcapsulelor | 129 |
| Parametrii de culoare ai microcapsulelor | 130 |
| Cinetica de degradare termică | 130 |
| 6.3.4. Concluzii parțiale | 132 |
| Referințe bibliografice | 133 |
| Capitolul 7. Concluzii generale | 134 |
| Capitolul 8. Contribuții originale și perspective de continuare a cercetărilor | 136 |
| Capitolul 9. Diseminarea rezultatelor | 136 |
| ANEXA 1..... | 139 |
| ANEXA 2..... | 142 |

Introducere

Extractele vegetale bogate în compuși polifenolici, în special antociani, sunt recunoscute ca având un potențial ridicat în industria alimentară, unde pot fi utilizați sub formă de coloranți alimentari, mai ales dacă ar fi disponibile sub formă de preparate comerciale purificate și stabile (Francis și Markakis, 1989). Compușii polifenolici, în special antocianii, sunt instabili la temperatură, pH, oxigen, dar și lumină în momentul procesării și depozitării (Sadilova și colab., 2007). În industria alimentară, procesele de tratament termic al produselor pe bază de fructe implică temperaturi de 50°C, până la 150°C, cu durată scurtă, și sunt necesare pentru a extinde termenul de valabilitate (Abu-Ghannam și Jaiswal, 2015).

Consumul de alimente bogate în polifenoli poate conduce la prevenirea bolilor cardiovasculare și neurodegenerative, osteoporoză și cancer, aspecte evidențiate de studii epidemiologice, clinice și pe animale (Nucara și colab., 2013). Antocianii reprezintă un grup de polifenoli naturali, responsabili de culoarea atractivă a numeroase fructe și produse derivate și prezintă o importanță deosebită datorită activității lor antioxidante (Mazza și Miniati, 1993, Wang și Xu, 2007), însă se degradează ușor sub acțiunea factorilor de mediu, cum ar fi: lumină, pH, temperatură, prezența oxigenului și a enzimelor (Dey, 2012). Mai mult decât atât, dezvoltarea coloranților sau a ingredientelor funcționale pe bază de antociani este limitată datorită stabilității reduse, precum și a interacțiunii cu alți compuși din matricile alimentare. Tentativele de a îmbunătăți biodisponibilitatea polifenolilor se bazează pe faptul că aceștia utilizează diferite matrici de transport, cum ar fi: β -lactoglobulina (Gholami și Bordbar, 2014, Li și colab., 2013), seralbumina (Soares și colab., 2007), proteinele din zer (Rodriguez și colab., 2015), α -lactalbumina (Al-Hanish și colab., 2016) sau lipozomi (Bonechi și colab., 2012).

Tehnologia de încapsulare a fost utilizată în industria alimentară pentru a proteja compușii bioactivi față de condițiile adverse de mediu, cum ar fi efectele nedorite ale luminii, umidității și ale oxigenului, contribuind astfel la creșterea termenului de valabilitate al produsului și promovarea unei eliberări controlate a materialului încapsulat (Murali și colab., 2015, Shahidi și Han, 1993).

Desigur, există numeroase studii în literatura de specialitate care prezintă rezultatele ce fac referire la implicațiile compușilor biologic activi și în special a antocianilor din diferite surse, în industria alimentară, însă cercetătorii consideră că încă mai există multe posibilități neexploatate de a îmbunătăți procedeele de prelucrare și formulare, în vederea îmbogățirii gamei de ingrediente funcționalizate.

Teza de doctorat intitulată **"Compozite funcționale pe bază de proteine din zer și extracte vegetale din fructe roșii"** a vizat studiul și valorificarea potențialului bioactiv al compușilor biologic activi din vișine și fructe de soc, în principal antocianii, în vederea optimizării parametrilor de procesare. Astfel, prin tehnici moderne de analiză (spectroscopia de fluorescență, cromatografie lichidă de înaltă performanță, FT-IR, microscopie confocală, digestibilitate *in vitro*, studii de andocare moleculară) și de analiză statistică a datelor experimentale, au fost analizate modificările structurale și funcționale, ale compușilor biologic activi, în special ale antocianilor din două soiuri de fructe roșii autohtone, vișine (*Prunus cerasus* L.) și fructe de soc (*Sambucus nigra* L.). S-a evaluat stabilitatea la temperatură și sau optimizat tratamentele de procesare pentru menținerea nealterată a proprietăților funcționale în condiții de procesare care să asigure totodată stabilitatea biochimică a produselor finite.

Cercetările derulate pe parcursul studiilor de doctorat au vizat următoarele obiective științifice:

- Extracția, identificarea și caracterizarea antocianilor din pielețe de vișine și fructe de soc autohtone, cu scopul de a determina condițiile optime de obținere și păstrare a produselor bogate în compuși biologic activi.

- Analiza modificărilor structurale și conformaționale ale compușilor polifenolici din pielețele de vișine și fructele de soc, varietățile *Prunus cerasus* L. și *Sambucus nigra* L., prin variația temperaturii, în vederea stabilirii unor corelații între condițiile de procesare și modificările structurale ce au loc, în vederea menținerii funcției biologice active.
- Studiul condițiilor fizico-chimice în care are loc modificarea structurală, funcțională și conformațională a antocianilor din pielețe de vișine și fructele de soc, prin modelare cinetică, studii de andocare moleculară și analiză statistică.
- Analiza interacțiunii antocianilor cu proteinele prin tehnici de microîncapsulare, îmbunătățind astfel biodisponibilitatea și bioaccesibilitatea compușilor biologic bioactivi, dar păstrând în același timp și acțiunea anti-proliferativă. Spectroscopia FT-IR a fost utilizată ca tehnică complementară pentru studiul modificărilor din structura secundară a proteinelor în condițiile experimentale testate. Funcționalitatea microparticulelor a fost testată și certificată prin activitate antioxidantă, activitate antimicrobiană și digestibilitate *in vitro*.

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

I. STUDIUL DOCUMENTAR, intitulat "**Tendențe moderne privind studiul și valorificarea compușilor bioactivi din fructe roșii autohtone**" cuprinde patru capitole, în care se prezintă date recente din literatura de specialitate privind biodisponibilitatea compușilor biologic activi din vișine (*Prunus cerasus* L.) și fructele de soc (*Sambucus nigra* L.), caracterizarea morfologică și compozițională, precum și proprietățile bioactive, farmacocinetica și mecanismele de acțiune ale acestor compuși. Sunt descrise date actuale privind proteinele din zer, acestea fiind utilizate ca matrici pentru obținerea de ingrediente funcționalizate.

II. STUDIUL EXPERIMENTAL prezintă rezultatele investigațiilor originale realizate pe parcursul stagiului doctoral, și este structurat în trei capitole, după cum urmează:

Capitolul 5. Intitulat Studiul și valorificarea potențialului bioactiv al compușilor fenolici din vișine (*Prunus cerasus* L.) cuprinde trei subcapitole și anume:

5.1. "Caracterizarea fitochimică și cinetica de degradare termică a compușilor bioactivi din extractele din pieleță de vișine (*Prunus cerasus* L.)", care prezintă datele obținute privind extracția, separarea, identificarea, cuantificarea și caracterizarea biochimică a compușilor biologic activi din pielețele de vișine (*Prunus cerasus* L.), soi autohton, prin utilizarea metodelor spectrofotometrice, spectrofluorimetrice și a tehnicilor de cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC). De asemenea, sunt prezentate rezultatele investigațiilor privind comportamentul chimic și biochimic al compușilor biologic activi în funcție de temperatură, iar mecanismele de degradare termică au fost descrise prin modele cinetice de ordinul I.

5.2. "Evaluarea mecanismelor de legare a antocianilor din extractul de vișine de β -lactoglobulină", care prezintă datele obținute privind interacțiunea dintre antocianii din extractul de vișine și proteina β -lactoglobulina (β -LG) pe baza experimentelor de quenching. Pentru a înțelege efectele tratamentului termic asupra acestora s-au utilizat metode spectrofotometrice, precum fluorescența *in situ*, diagrama de faze, spectrele sincron și experimente de quenching cu KI și acrilamidă. De asemenea, s-au utilizat metode de andocare moleculară care au furnizat detalii privind afinitatea și situsul de legare al cianidin-3-O-rutinozid, unul din antocianii majoritari prezent în extractul de vișine.

5.3. "Ingrediente funcționale obținute prin microîncapsularea antocianilor din extractul de vișine utilizând proteinele din zer drept matrice de încapsulare", care prezintă date legate de fezabilitatea încapsulării antocianilor din extractul de vișine folosind

β -lactoglobulina ca agent de încapsulare, în diferite forme și utilizând liofilizarea ca tehnică de microîncapsulare. Microparticulele obținute au fost analizate pentru conținutului de compuși biologic activi, eficiența încapsulării și modificările de culoare. Microstructura particulelor a fost caracterizată prin microscopie confocală. Spectroscopia FT-IR a fost utilizată ca tehnică complementară pentru studiul modificărilor din structura secundară a β -LG în condițiile experimentale testate. Funcționalitatea microparticulelor a fost testată ca activitate antioxidantă, activitate antimicrobiană și digestibilitate *in vitro*. De asemenea, în acest capitol se prezintă date cu referire la microîncapsularea compușilor polifenolici din extractul de vișine prin tehnici de liofilizare. Microcapsulele au fost caracterizate privind eficiența încapsulării, cantitatea de fitocompuși, culoare, activitate antioxidantă, microstructura capsulelor și digestibilitatea *in vitro*.

Capitolul 6 intitulat "**Studiul și valorificarea compușilor biologic activi din fructe de soc (*Sambucus nigra*)**" care este structurat în trei subcapitole și anume:

6.1. "Caracterizarea fitochimică și cinetica de degradare termică a compușilor bioactivi din extractele din fructele de soc (*Sambucus nigra* L.)", care prezintă datele obținute privind extracția, separarea, identificarea, cuantificarea și caracterizarea biochimică a compușilor biologic activi din fructele de soc (*Sambucus nigra*), soiuri autohtone, prin utilizarea metodelor spectrofotometrice, spectrofluorimetrice și a tehnicilor de cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC). De asemenea, sunt prezentate rezultatele investigațiilor privind comportamentul chimic și biochimic al compușilor biologic activi în funcție de temperatură, iar mecanismele de degradare termică au fost descrise prin modele cinetice de ordinul I.

6.2. "Evaluarea mecanismelor de legare dintre compușii bioactivi din fructele de soc și proteinele din zer", care prezintă caracterizarea proceselor de legare ale extractului din fructe de soc și izolatul proteic din zer, în perspectiva dezvoltării de noi produse/compozite funcționale sau nutraceutice. Pentru a putea determina mecanismul de legare al antocianilor și flavonoidelor din extractul de fructe de soc s-au utilizat experimente de quenching.

6.3. "Investigații privind microîncapsularea compușilor bioactivi din fructele de soc (*Sambucus nigra* L.) utilizând ca matrice proteinele din zer", care prezintă date legate de microîncapsularea compușilor polifenolici din extractul din fructe de soc prin tehnici de liofilizare. De asemenea, microcapsulele au fost caracterizate privind eficiența încapsulării, cantitatea de fitocompuși, culoare, activitate antioxidantă, microstructura capsulelor și digestibilitatea *in vitro*.

Fiecare capitol al studiului experimental este structurat în următoarele subcapitole: *Introducere*, în care se prezintă importanța cercetării și obiectivele studiilor realizate; *Materiale și metode*, unde sunt descrise materialele, reactivii utilizați și metodele de investigare, de prelucrare și interpretare a datelor experimentale; *Rezultate și discuții*, în care sunt conturate rezultatele obținute, precum și compararea acestora cu date din literatura de specialitate; *Concluzii parțiale și Referințe bibliografice*.

Capitolul 7, Concluzii generale, prezintă concluziile finale rezultate în urma investigațiilor realizate, ce au vizat studiul compușilor biologic activi proveniți din matrici derivate din vișine și fructe de soc, prin monitorizarea comportamentului biochimic în diferite condiții de temperatură, cu identificarea condițiilor de procesare în care degradarea și modificarea funcțiilor biologice ale acestor compuși bioactivi să fie minime.

Teza de doctorat cuprinde 154 pagini, în care sunt incluse 44 figuri și 21 tabele. Studiul documentar reprezintă 20 %, iar partea experimentală 80 %.

În final, sunt prezentate **contribuțiile originale** ale tezei de doctorat, cu impact în dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspectivele pentru continuarea cercetărilor, precum și

Compozite funcționale pe bază de proteine din zer și extracte vegetale din fructe roșii

diseminarea rezultatelor obținute în domeniul de cercetare abordat. Astfel, rezultatele cercetărilor au fost valorificate prin elaborarea a **9 articole științifice**, publicate, **7 articole** în reviste cotate ISI (*Food Science and Technology International, LWT - Food Science and Technology, European Food Research and Technology, Journal of Food Engineering, International Journal of Food Properties*) și **2 articole** indexate în baze de date internaționale (*The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI – Food Technology*) precum și **10 comunicări** la manifestări științifice reprezentative pentru domeniul biotehnologiei, din străinătate și din țară.

Activitățile de cercetare din cadrul tezei de doctorat au fost derulate cu ajutorul infrastructurii moderne de cercetare a *Centrului integrat de cercetare, expertiză și transfer tehnologic (BioAliment-TehnIA)* (www.bioaliment.ugal.ro), din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați.

Pe parcursul studiilor doctorale, doctoranda a fost implicată în echipa de cercetare a următoarelor proiecte, cu tematici convergente tezei de doctorat, după cum urmează - PN-II-RU-TE-2014-4-0115/2015-2017 (www.funfood.ugal.ro), cu titlul "*Compozite funcționale pe bază de proteine din zer și extracte vegetale pentru aplicații în industria alimentară*", director de proiect Prof.dr.ing. Nicoleta Stănciuc.

Teza s-a realizat sub coordonarea științifică a Prof.dr.ing. Gabriela-Elena BAHMIM, în calitate de conducător de doctorat și a comisiei de îndrumare alcătuită din: Prof.dr.ing. Nicoleta STĂNCIUC, Prof.dr.ing. Gabriela RÂPEANU și Prof.dr.ing. Iuliana APRODU.

Capitolul 5. Studiul și valorificarea potențialului bioactiv al compușilor fenolici din vișine (*Prunus cerasus* L.)

5.1. Caracterizarea fitochimică și cinetica de degradare termică a compușilor bioactivi din extractele din pieliță de vișine (*Prunus cerasus* L.)

5.1.1. Aspecte generale

Beneficiile compușilor biologic activi din vișine sunt bine studiate, dar cu toate acestea puține studii abordează cinetica de degradare termică a acestor compuși în condiții diferite de procesare temperatură-timp. Prin urmare, în vederea descrierii funcționalității diferiților compuși biologic activi din pieliță de vișine la tratamentul termic, modificările conținutului de antociani monomerici (CAM), polifenoli totali (CPT), flavonoide totale (CFT) și activitatea antioxidantă au fost investigate în intervalul de temperatură 100-160°C, pentru 0-120 minute. Adicional, proprietățile fluorescente ale extractelor au fost analizate după tratamentul termic menționat prin excitare la lungimi de undă de 270 nm și 340 nm.

5.1.2. Materiale și metode

Vișinele românești (*Prunus cerasus* L.), varietatea *Negre de Bistrița*, au fost achiziționate dintr-un supermarket local și transportate în laborator, unde au fost decojite manual. Pelițele au fost spălate cu apă distilată, uscate la temperatura camerei, apoi liofilizate utilizându-se echipamentul Freeze Dryer ALPHA 1-4 LDplus (Martin Christ, Osterode, Germania). Pelițele liofilizate au fost mojarate, pudra rezultată fiind depozitată în recipiente de plastic ermetic închise, la temperatura de -20°C, pentru a fi analizată ulterior.

5.1.3. Rezultate și discuții

Caracterizarea profilului fitochimic al extractului din pieliță de vișine (*Prunus cerasus* L.)

În urma analizei HPLC a extractului de vișine, conform **Figurii 5.8.**, profilul cromatografic a relevat prezența a patru compuși, dintre aceștia fiind identificați doar 3, respectiv cianidin-3-rutinozid, cianidin-3-glucozid, peonidin-3-glucozid.

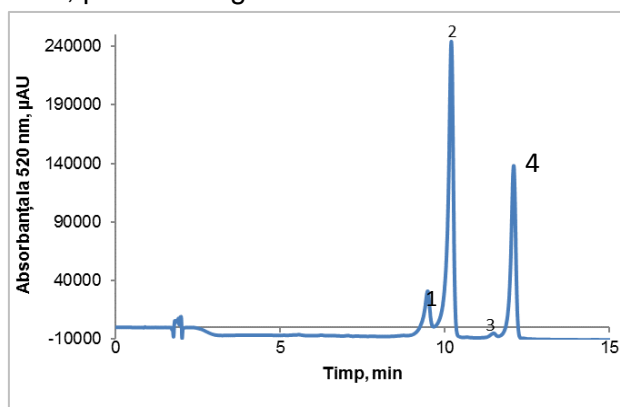


Figura 5.8. Profilul cromatografic al antocianilor din extractul din pieliță de vișine, monitorizat la lungimea de undă de 520 nm

Conținutul de antociani monomerici din extractul din pieliță de vișine este de $8,84 \pm 0,08$ mg C3G/100 g s.u. Majoritatea autorilor au exprimat cantitatea de antociani monomerici în mg per probă proaspătă, astfel încât este destul de dificilă compararea rezultatelor.

Conținutul total de flavonoide din extractul de vișine analizat, exprimat ca echivalenți catehină (EC), este de $198,05 \pm 7,61$ mg EC/100 g. Conținutul de polifenoli totali, exprimat ca mg echivalenți acid galic (EAG), a fost determinat la valori de $246,4 \pm 15,58$ mg EAG/100 g s.u.

Extractul de vișine a prezentat un procent de inhibiție asupra radicalului DPPH de $93,80 \pm 0,11\%$. Este dificil de realizat o comparație cu literatura din cauza metodelor multiple de exprimare a activității antioxidante.

Influența tratamentului termic asupra intensității fluorescenței și a profilului fitochimic al extractului din pieliță de vișine

În cazul extractului din pieliță soiului românesc de vișine, prezența celui de-al doilea peak în domeniul vizibil se poate datora concentrației foarte scăzute în baze quinoidale.

În urma tratamentului termic, au rezultat modificări structurale ce au condus la schimbări semnificative ale intensității fluorescenței (**Figura 5.10. a și b**). În urma excitării la lungimea de undă de 270 nm, s-a observat o scădere a intensității fluorescenței la temperaturi mai mari de 130°C , iar maximul de emisie s-a situat în jurul valorii de 320 nm. În cazul probelor tratate la temperaturi mai mari de 130°C se observă prezența unui peak secundar, situat în jurul valorii λ_{max} 375 nm (**Figura 5.10. a**).

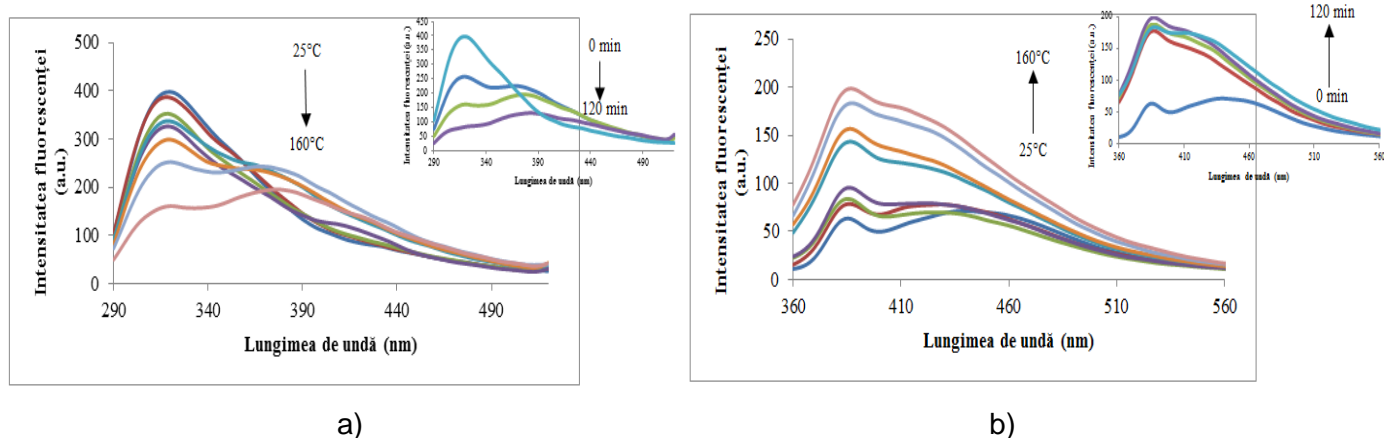


Figura 5.10. Spectrele de fluorescență ale extractului din pieliță de vișine, după menținere timp de 90 de minute la tratament termic la diferite temperaturi, excitație la lungimea de undă 270 nm (a) și 340 nm (b).

Inserție: Spectrele de fluorescență ale extractului din pieliță de vișine tratat termic la temperatura de 130°C , în intervalul 0-120 minute

În extractul din pieliță de vișine tratat la temperatura de 120°C , s-a înregistrat un maxim de emisie la lungimea de undă de 320 nm, comparativ cu proba netratată care a emis un maxim la λ_{max} 382 nm, prin urmare s-a înregistrat un red-shift de 62 nm. Se observă o creștere a intensității fluorescenței odată cu creșterea temperaturii, în momentul în care probele au fost excitate la lungimea de undă λ_{max} 340 nm (**Figura 5.10. b**), în timp ce spectrul ce prezintă al doilea maxim înregistrat la emisie dispăre la temperaturi mai mari de 130°C . În urma tratamentului termic se observă o scădere a concentrației de antociani monomerici. Procentual se observă o reducere a conținutului de antociani monomerici cu 42% și 96% la, temperatura de 100°C și respectiv 150°C (**Figura 5.11.**).

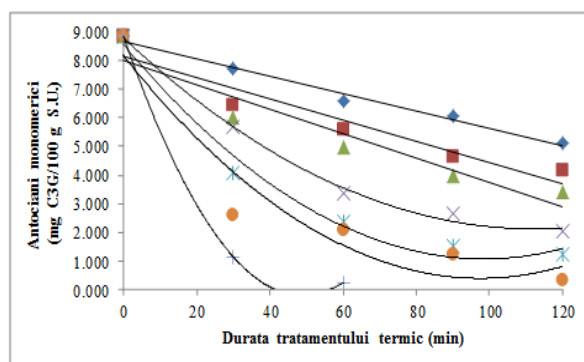


Figura 5.11. Degradarea termică a antocianilor monomerici din extractul din pielea de vișine (♦ 100°C, ■ 110°C, ▲ 120°C, × 130°C, * 140°C, ● 150°C și + 160°C)

În ceea ce privește influența temperaturii asupra compușilor flavonoidici, se observă o creștere a conținutului de flavonoide totale (CTF) la valori ale temperaturii de la 100°C la 160°C, cu menținere timp de 30 minute, de la 153,06±1,90 la 211,03±9,52 mg EC/100 g, iar la temperaturi mai mari de 120°C, cu timp de menținere de 120 minute se observă o scădere a cantității de flavonoide, de la 161,68±1,14 la 149,76±2,66 mg EC/100 g (Tabelul 5.2.).

După cum se poate observa în Tabelul 5.2., după tratament termic la temperatura de 120°C, timp de 30 minute, conținutul de polifenoli totali (CPT) a scăzut până la valoarea de 198,32±1,03 mg EAG/100 g s.u., în timp ce tratamentul termic la temperatura de 160°C, timp de 60 minute, a condus la creșterea concentrației în polifenoli până la valoarea de 263,3±1,55 mg EAG/100 g s.u.

Tabelul 5.2. Conținutul de polifenoli totali și flavonoide totale în extractul din pielea de vișine la diferite combinații de temperatură-timp

| Temperatura °C | Timpul de încălzire (min) | CPT (mg EAG/100 g s.u.) | CTF (mg EC/100 g s.u.) |
|----------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|
| 100 | 0 | 246,4±15,58 | 198,05±7,61 |
| | 30 | 198,32±1,03 | 153,06±1,90 |
| | 60 | 207,13±4,15 | 167,34±3,80 |
| | 90 | 203,10±10,90 | 169,23±0,38 |
| | 120 | 189,87±2,59 | 170,04±5,33 |
| 110 | 0 | 246,4±15,58 | 198,05±7,61 |
| | 30 | 195,75±2,59 | 167,12±8,38 |
| | 60 | 204,19±1,03 | 148,75±2,66 |
| | 90 | 205,66±5,19 | 166,53±4,95 |
| | 120 | 200,52±6,23 | 172,46±9,52 |
| 120 | 0 | 246,4±15,58 | 198,05±7,61 |
| | 30 | 210,07±3,11 | 185,12±0,76 |
| | 60 | 219,99±0,51 | 175,42±2,28 |
| | 90 | 208,23±4,67 | 170,57±0,77 |
| | 120 | 212,64±5,71 | 161,68±1,14 |
| 130 | 0 | 246,4±15,58 | 198,05±7,61 |
| | 30 | 200,154±1,55 | 183,77±6,85 |
| | 60 | 197,950±0,51 | 179,27±1,90 |
| | 90 | 196,114±1,03 | 172,19±0,76 |
| | 120 | 182,890±3,11 | 171,76±1,91 |
| 140 | 0 | 246,4±15,58 | 198,05±7,61 |
| | 30 | 204,93±4,15 | 180,00±1,93 |
| | 60 | 199,42±4,67 | 178,92±1,14 |
| | 90 | 184,72±2,60 | 172,46±0,39 |
| | 120 | 181,05±2,59 | 165,57±0,77 |
| 150 | 0 | 246,4±15,58 | 198,05±7,61 |
| | 30 | 221,82±3,12 | 182,97±0,77 |
| | 60 | 215,58±1,55 | 180,81±1,52 |
| | 90 | 208,60±4,15 | 173,00±1,91 |
| | 120 | 174,44±1,58 | 155,49±3,04 |
| 160 | 0 | 246,4±15,58 | 198,05±7,61 |
| | 30 | 191,33±10,90 | 211,25±0,39 |
| | 60 | 263,33±1,55 | 177,04±9,52 |
| | 90 | 188,40±2,59 | 169,76±5,71 |
| | 120 | 169,29±1,55 | 149,76±2,66 |

Compozite funcționale pe bază de proteine din zer și extracte vegetale din fructe roșii

În urma tratamentului termic, capacitatea antioxidantă, exprimată ca activitate antiradicalică asupra 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH RSA), a scăzut. În intervalul de temperatură 100 – 150°C, s-a înregistrat o scădere a capacității antioxidante de 10-17%, pentru un timp de menținere de 60 minute (**Figura 5.12**). Odată cu creșterea timpului de menținere la tratamentul termic se observă o descreștere graduală a capacității antioxidante, astfel la temperatura de 150°C, după 120 minute, s-a înregistrat o scădere cu 30%, iar la temperatura de 160°C se observă o degradare de aproximativ 99%.

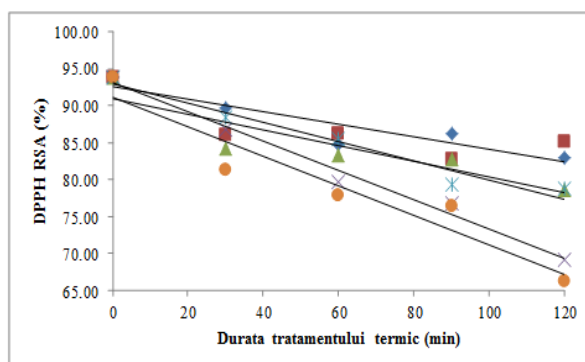


Figura 5.12. Degradarea izotermă a DPPH RSA în extractul din pielită de vișine, tratat la diferite temperaturi (◆ 100°C, ■ 110°C, ▲ 120°C, × 130°C, ✱ 140°C, ● 150°C și + 160°C)

Cinetica de degradare termică a compușilor bioactivi din extractul de vișine

Pentru cinetica de degradare termică cu influență asupra intensității fluorescenței (IF), a antocianilor și a activității antioxidante s-a utilizat modelul cinetic de ordinul I.

În **Tabelul 5.3.** sunt prezentați parametrii cinetici de variație a intensității fluorescenței (IF), a conținutului de antociani monomerici (CAM), a activității antioxidante (DPPH RSA) și a conținutului de flavonoide totale (CFT), și anume viteza de degradare (min^{-1}) și energia de activare (E_a).

Tabelul 5.3. Parametrii cinetici (viteza de degradare – k și energia de degradare – E_a) de variație în urma tratamentului termic, în intervalul de temperatură 100-160°C, în extractul din pielită de vișine

| Compus | Temperatura °C | $k \cdot 10^2 (\text{min}^{-1})$ | R^2 | $t_{1/2} (\text{min})$ | $E_a (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ | R^2 |
|----------|----------------|----------------------------------|-------|------------------------|---|-------|
| IF | 100 | 0,04±0,01 | 0,84 | 1504,87±69,31 | 74,23±3,17 | 0,99 |
| | 110 | 0,09±0,01 | 0,97 | 752,43±69,30 | | |
| | 120 | 0,18±0,04 | 0,85 | 376,21±17,32 | | |
| | 130 | 0,25±0,07 | 0,93 | 273,61±9,90 | | |
| | 140 | 0,43±0,12 | 0,93 | 158,40±5,78 | | |
| | 150 | 0,96±0,17 | 0,98 | 71,66±4,08 | | |
| | 160 | 1,24±0,45 | 0,98 | 55,73±1,45 | | |
| CAM | 100 | 0,43±0,12 | 0,98 | 158,40±5,77 | 54,19±5,88 | 0,94 |
| | 110 | 0,62±0,18 | 0,92 | 111,47±3,85 | | |
| | 120 | 0,78±0,13 | 0,90 | 88,52±5,33 | | |
| | 130 | 1,22±0,45 | 0,89 | 56,78±1,54 | | |
| | 140 | 1,65±0,56 | 0,80 | 41,80±1,23 | | |
| | 150 | 2,46±0,47 | 0,75 | 28,12±1,47 | | |
| | 160 | 6,05±1,28 | 0,82 | 11,44±0,54 | | |
| CFT | 130 | 0,11±0,05 | 0,85 | 601,95±13,86 | 38,38±3,78 | 0,98 |
| | 140 | 0,13±0,04 | 0,84 | 501,62±17,32 | | |
| | 150 | 0,18±0,08 | 0,93 | 376,21±8,66 | | |
| | 160 | 0,25±0,18 | 0,83 | 273,61±3,85 | | |
| DPPH RSA | 100 | 0,09±0,01 | 0,85 | 752,43±69,32 | 31,47±3,51 | 0,95 |
| | 110 | 0,11±0,02 | 0,83 | 601,95±34,65 | | |
| | 120 | 0,13±0,04 | 0,84 | 501,62±17,32 | | |
| | 130 | 0,23±0,05 | 0,98 | 300,97±13,86 | | |
| | 140 | 0,25±0,08 | 0,95 | 273,61±8,66 | | |
| | 150 | 0,27±0,09 | 0,91 | 250,81±7,70 | | |
| | 160 | 8,12±1,48 | 0,94 | 8,52±0,46 | | |

În cazul intensității fluorescenței și a conținutului de antociani monomerici totali, constanta vitezelor de degradare a crescut odată cu creșterea temperaturii, situându-se între valorile $0,04 \pm 0,01 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ și $0,43 \pm 0,12 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ și respectiv $1,24 \pm 0,45 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ și $6,05 \pm 1,28 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$.

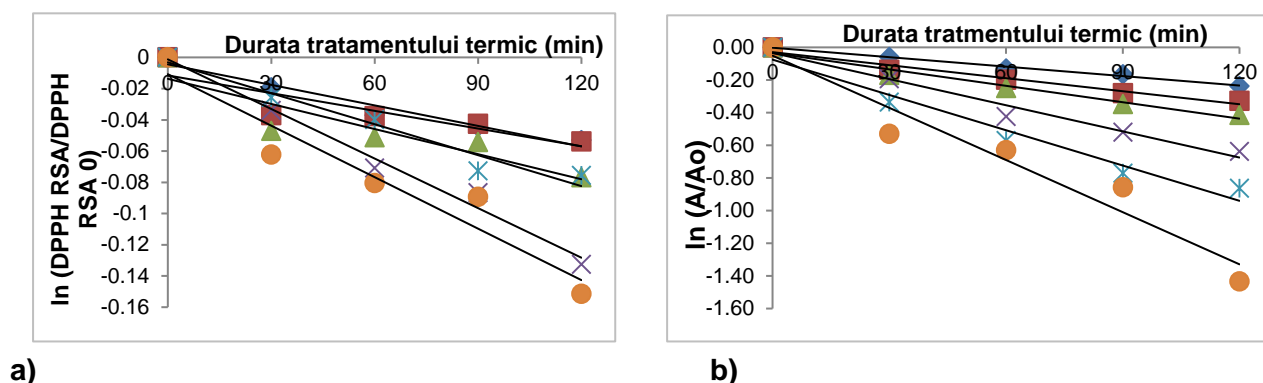


Figura 5.14. Degradarea izotermă a antocianilor monomerici (a) și DPPH RSA (b) în extractul din pielea de vișine, tratat la diferite temperaturi (◆100°C, ■110°C, ▲120°C, ×130°C, *140°C și ●150°C)

Cinetica de degradare termică a antocianilor urmează o cinetică de ordinul I, cu valori ale constantelor vitezelor de reacție între $0,69$ și $3,94 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Conform valorilor estimate ale constantelor de viteză k putem afirma că antocianii sunt compușii cei mai termolabili.

Valorile timpului de înjumătățire $t_{1/2}$ s-au situat între $1504,87 \pm 69,31 \text{ min}$. pentru schimbările în intensitatea fluorescenței, la temperatura de 100°C și $8,52 \pm 0,46 \text{ min}$. pentru DPPH RSA, la temperatura de 160°C (**Tabelul 5.3.**).

Energia de activare pentru schimbările în intensitatea de fluorescență este $74,23 \pm 3,17 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, iar energia de activare pentru degradarea termică a antocianilor monomerici este $54,19 \pm 5,88 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Valoarea ridicată a energiei de activare indică faptul că degradarea antocianilor din extractul din pielea de vișine prezintă afinitate pentru temperaturi înalte.

Degradarea conținutului total de flavonoide urmează modelul cinetic de ordinul I numai pentru valori ale temperaturii mai mari de 120°C . Conform datelor prezentate în **Tabelul 5.3.**, coeficientul R^2 a avut valori între $0,83$ și $0,93$ iar valorile lui k au crescut de la valoarea $0,11 \pm 0,05 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, pentru temperatura de 120°C la $0,25 \pm 0,18 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, pentru temperatura de 160°C . Energia de activare pentru degradarea termică a flavonoidelor este $38,38 \pm 3,78 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Valorile constantelor de viteză k pentru degradarea termică a DPPH RSA au crescut odată cu creșterea temperaturii, de la $0,09 \pm 0,01 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, pentru temperatura de 100°C , la $8,12 \pm 1,48 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, la temperatura 160°C .

Energia de activare pentru degradarea activității antioxidante este $31,47 \pm 3,51 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

5.1.4. Concluzii parțiale

Studiile au urmărit evaluarea modificărilor structurale induse de tratamentul termic asupra compușilor bioactivi din extractele de *Prunus cerasus* L. cu ajutorul spectroscopiei de fluorescență, a analizelor de separare cromatografică de tip HPLC și a studiilor cinetice de degradare termică. Prin cromatografie HPLC în extractul din pielea de vișine s-a evidențiat prezența a patru antociani, cianidin-3-rutinozid fiind antocianul predominant, urmat de cianidin-3-gluciozid, peonidin-3-glucozid și un derivat neidentificat.

Profilul fitochimic global a evidențiat un conținut total de antociani monomerici de $8,84 \pm 0,08 \text{ mg C3G/100 g s.u.}$, polifenoli totali de $246,4 \pm 15,58 \text{ mg EAG/100 g s.u.}$, flavonoide

totale de $198,05 \pm 7,61$ mg EC/100 g. Profilul fitochimic a fost corelat cu activitatea antioxidantă a extractului, exprimată în procent de inhibiție a radicalului DPPH, de $93,80 \pm 0,11\%$.

Prin spectroscopie de fluorescență s-a monitorizat comportamentul compușilor antocianidini din extract, care au înregistrat un maxim de emisie la λ_{max} 386 nm, în momentul în care proba a fost excitată la lungimea de undă 270 nm. Spectrul cu două benzi de emisie s-a înregistrat în momentul excitării la lungimea de undă de 340 nm, maximele fiind înregistrate la λ_{max} 386 nm și 440 nm. În intervalul de temperatură 130 – 160°C s-au înregistrat schimbări semnificative ale intensității fluorescenței, observându-se un red – shift de 62 nm, după o durată a tratamentului termic de 120 de minute, la temperatura de 160°C.

Degradarea termică a compușilor fitochimici din extractul din pielețe de vișine în intervalul de temperatură 130-160°C a urmat un model cinetic de ordinul I, care a permis estimarea parametrilor cinetici necesari optimizării proceselor industriale din perspectiva obținerii unor produse cu un conținut bogat în compuși biologic activi și cu activitate antioxidantă ridicată.

Odată cu creșterea intensității tratamentului termic asupra extractului din pieleță de vișine, s-a observat o creștere a concentrației de flavonoide în intervalul de temperatură 100 – 120°C, urmând apoi o degradare cinetică de ordinul I pentru intervalul de temperatură 120 – 160°C. În ceea ce privește concentrația de polifenoli din extractul din pieleță de vișine s-a observat o creștere în primele 60 de minute de tratament termic la temperatură constantă, urmată apoi de o ușoară descreștere a concentrației.

Analiza comparativă a valorilor constantelor vitezelor de degradare termică a evidențiat o susceptibilitate mai mare de degradare a antocianilor, urmați de flavonoide și activitatea antioxidantă, fapt care demonstrează o dependență semnificativ mai mare a antocianilor față de temperatură. Astfel, energia de activare a antocianilor monomerici din extractul din pieleță de vișine s-a caracterizat printr-o valoare a E_a de $54,19 \pm 5,88$ kJ/Mol, urmată de flavonoidele totale cu $38,38 \pm 3,78$ kJ/Mol și activitatea antioxidantă cu $31,47 \pm 3,51$ kJ/Mol.

Cercetările realizate sunt valoroase în perspectiva unor studii viitoare prin care se profilează ideea utilizării produselor derivate din vișine (extracte, pudre) ca ingrediente funcționale pentru formularea unor produse alimentare funcționale (băuturi, produse de panificație, produse lactate fermentate, produse de patiserie și cofetărie, produse zaharoase etc).

Informațiile privind factorii ce determină o degradare a compușilor fenolici din extractele vegetale sunt necesare pentru a optimiza condițiile de procesare industrială și pentru a minimiza pierderea sau degradarea componentelor bioactive.

5.2. Evaluarea mecanismelor de legare ale antocianilor din extractul de vișine de β -lactoglobulină

5.2.1. Aspecte generale

Obiectivul principal al prezentului studiu a fost acela de a studia interacțiunea dintre antocianii din extractul de vișine (AEV) și β -LG pe baza experimentelor de quenching. Pentru a elucidă efectele tratamentului termic asupra complexului β -LG-AEV s-au utilizat metode spectrofotometrice, precum fluorescența *in situ*, diagrama de faze, spectrele sincron și experimente de quenching cu KI și acrilamidă. De asemenea, s-au utilizat metode de andocare moleculară pentru a furniza detalii privind afinitatea și situsul de legare al cianidin-3-O-rutinozid, unul dintre antocianii majoritari prezenți în extractul de vișine (Blando și colab., 2004).

5.2.2. Materiale și metode

Reactivi

β -LG din lapte bovin (de puritate 90%, variante genetice A și B), acid 1-anilin-8-naftalensulfonic (ANS), acrilamidă și iodură de potasiu (KI) au fost achiziționate de la Sigma (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO).

5.2.3. Rezultate și discuții

Studii de quenching privind β -lactoglobulina tratată termic și extractul antocianic din vișine

Interacțiunea dintre β -LG și extractul din pieliță de vișine a fost examinată prin investigarea influenței creșterii concentrației de extract asupra intensității β -LG tratată termic, la temperaturi cuprinse între 25°C și 100°C, cu durata de menținere de 15 min. Intensitatea fluorescenței a fost semnificativ influențată de creșterea concentrației de ligand, la toate temperaturile testate (**Figura 5.15.**).

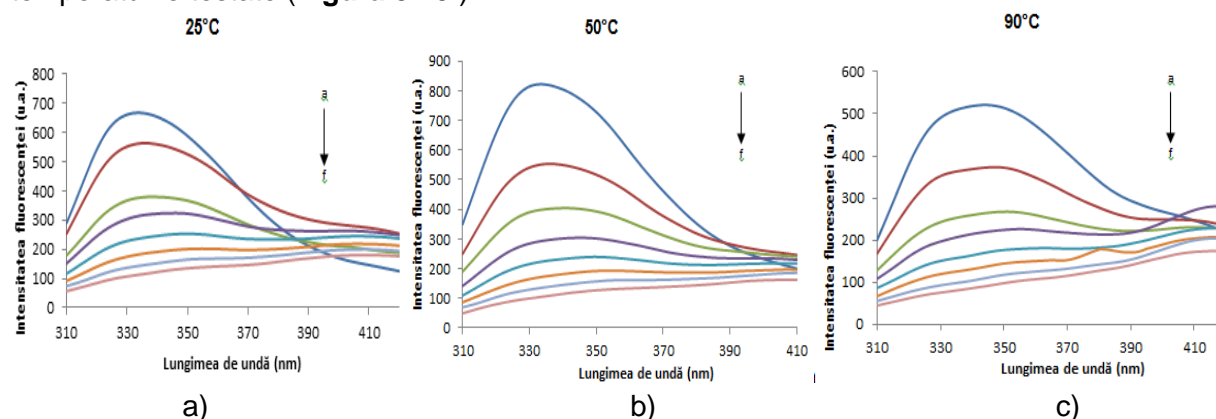


Figura 5.15. Spectrele de emisie care descriu interacțiunea dintre β -LG tratată la diferite temperaturi și extractul din pieliță de vișine. Concentrația de antociani din extractul din pieliță de vișine a variat de la 0 la 0,093 μ M

Adăugarea a 70 μ L de EAV în cazul β -LG netrată termic (**Figura 5.15. a**) a condus la apariția unui red shift de 75 nm în lungimea de undă la care se înregistrează maximul de intensitate (λ_{max}). În intervalul de temperaturi 50°C- 90 °C (**Figura 5.15. b și c**), au fost obținute fenomene semnificative de red-shifts de 78 nm și 76 nm.

Reprezentarea Stern-Volmer la diferite temperaturi este redată în **Figura 5.16.**, iar valorile calculate ale constantelor K_{SV} sunt prezentate în **Tabelul 5.4**. Cea mai mică valoare K_{SV} a fost calculată la temperatura de 100°C ($0,23 \pm 0,03 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), iar cea mai mare la temperatura de 80°C ($0,59 \pm 0,15 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), sugerând un grad mai mare de expunere a resturilor de Trp odată cu creșterea temperaturii, până la temperatura de 80°C și o scădere la temperaturi mai mari.

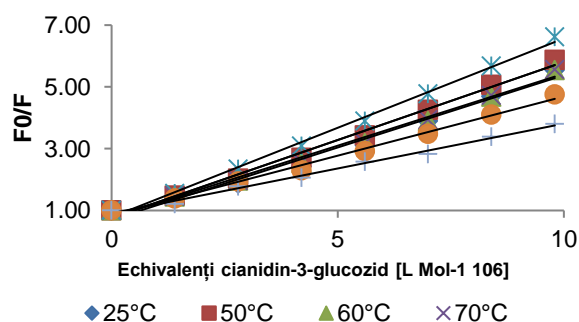


Figura 5.16. Reprezentarea Stern-Volmer pentru experimentele de quenching ale β -LG cu extractul din pieliță de vișine la diferite temperaturi

Tabelul 5.4. Parametrii de legare dintre β -LG tratată termic și extractul din pielită de vișine

| T(°C) | $K_{SV}(10^{-7}L \cdot mol^{-1})$ | R^b | $K_q(10^{-15}mol^{-1}s^{-1})$ | $K_b(10^{-7}L \cdot mol^{-1})$ | n | R^c |
|-------|-----------------------------------|-------|-------------------------------|--------------------------------|------------|-------|
| 25 | 1,69±0,02 | 0,998 | 1,69±0,02 | 1,60±0,27 | 1,55±0,13 | 0,990 |
| 50 | 1,54±0,12 | 0,997 | 1,54±0,12 | 1,04±0,08 | 1,13±0,07 | 0,995 |
| 60 | 1,57±0,02 | 0,996 | 1,57±0,02 | 1,05±0,19 | 1,09±0,12 | 0,998 |
| 70 | 1,91±0,02 | 0,999 | 1,91±0,02 | 1,02±0,02 | 1,13±0,05 | 0,999 |
| 80 | 1,95±0,16 | 0,999 | 1,95±0,16 | 0,88±0,08 | 1,02±0,007 | 0,999 |
| 90 | 1,67±0,07 | 0,998 | 1,67±0,07 | 0,70±0,08 | 0,93±0,008 | 0,998 |
| 100 | 2,29±0,12 | 0,994 | 2,29±0,12 | 0,99±0,03 | 0,93±0,02 | 0,998 |

^a deviația standard; ^b R este coeficientul de corelație pentru valorile K_{SV} ; ^c R este coeficientul de corelație pentru valorile K_b

Valoarea cea mai mică a lui K_{SV} a fost calculată pentru proba tratată la temperatura de 100°C ($0,23 \pm 0,03 \times 10^6 M^{-1}$) iar cea mai mare la temperatura de 80°C ($0,59 \pm 0,15 \times 10^6 M^{-1}$), ceea ce sugerează că resturile de Trp devin mai accesibile extractului EAV la tratament termic de până la temperatura de 80°C, ca apoi să scadă la temperaturi mai mari. Pentru a diferenția dacă mecanismul de quenching este dinamic sau static, s-au comparat valorile K_{SV} calculate la diferite temperaturi. Se poate observa o scădere a valorilor K_{SV} cu creșterea temperaturii, indicând un fenomen de quenching static.

În vederea stabilirii echilibrului între moleculele legate și cele libere, constanta aparentă de legare (K_a) și numărul locurilor de legare (n) la diferite temperaturi au fost derivate din panta și interceptul reprezentării grafice a $\log[(F_o - F)/F]$ vs. $\log [Q]$ (**Tabelul 5.4.**). Valorile K_a nu sunt semnificativ diferite în intervalul de temperatură studiat ($p > 0,05$), variind între $1,25 \pm 0,22 \times 10^{14} M^{-1}$, la temperatura de 25°C, la $1,18 \pm 0,16 \times 10^{14} M^{-1}$, la temperatura de 100°C. Se poate observa că la fiecare temperatură testată, valoarea n este mai mică decât 1, sugerând că legarea slabă a extractului din pielite de vișine de β -LG se poate datora multitudinii de compuși prezenți în extractul din pielite de vișine, care pot concura pentru situsurile de legare. Se remarcă totuși, o creștere a valorii n la temperatura de 100°C, de la $0,60 \pm 0,11$ la $0,88 \pm 0,03$, indicând creșterea afinității β -LG pentru antocianii din extractul din pielită de vișine.

Parametrii termodinamici oferă informații necesare pentru înțelegerea forțelor moleculare implicate în formarea complexului. Valorile entalpiei (ΔH), entropiei (ΔS) și energiei Gibbs (ΔG) sunt prezentate în **Tabelul 5.5.** La reprezentarea grafică a $\ln K_a$ versus T^{-1} , au fost obținute două zone de temperatură cu corelație liniară, primul în intervalul de temperaturi 25°C și 70°C, iar cel de-al doilea în intervalul de temperaturi 80°C - 100°C.

Valorile ΔG sunt pozitive și negative în cele două intervale de temperatură, indicând faptul că procesul este nespontan și respectiv spontan. În intervalul de temperatură de la 25°C până la 70°C, valorile pozitive și negative ale ΔH pentru ΔS indică faptul că interacțiunea dintre antocianii din extract și β -LG este endotermă cu o scădere a entropiei. La temperaturi mai mari, reacția este endotermă cu o valoare pozitivă pentru ΔS . Acest tip de reacție este reactant-favorizată la temperaturi scăzute și produs-favorizată la temperaturi ridicate.

Tabelul 5.5. Parametrii termodinamici la legarea extractului antocianic din pielea de vișine de β -LG

| T(K) | $\Delta H(\text{Jmol}^{-1})$ | $\Delta S(\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1})$ | $\Delta G(\text{Jmol}^{-1})$ | R^a |
|------|------------------------------|---|------------------------------|-------|
| 298 | | | -3269,71±41,25 | |
| 323 | | | -3171,21±13,5 | |
| 333 | | | -3131,81±2,16 | 0,95 |
| 343 | -4443,83±24,25 | -3.94 | -3092,41±18,96 | |
| 353 | | | -3053,01±29,87 | |
| 363 | | | -3013,61±25,38 | |
| 373 | | | -2974,21±18,36 | |

Prin urmare, din parametrii termodinamici prezentați în **Tabelul 5.5.**, valorile pozitive și respective negative ale ΔH și ΔS sugerează că forțele hidrofobe sunt implicate în formarea complexului β -LG-extract din pielea de vișine la temperaturi ridicate.

Interacțiunea *in silico* dintre cianidin-rutinozid și molecula de β -lactoglobulină

Abordarea *in silico* a fost utilizată pentru a investiga la nivel uni-molecular influența tratamentului termic asupra abilității β -LG de a lega molecula de cianidin-rutinozid (CYR). Proteina a fost tratată termic la temperaturi de 25°C și 90°C, apoi a fost echilibrată prin trepte de dinamică moleculară până când oscilațiile energiei potențiale au fost mai mici de 0,1%. Particularitățile și afinitățile dintre moleculele de β -LG și CYR au fost verificate pe modelele de asamblare rafinate de nivel înalt după ce au fost efectuate simulările de andocare moleculară.

Indiferent de temperatura simulată, structura secundară a β -LG a fost bine conservată la interacțiunea cu antocianul CYR. Datorită fenomenelor de pliere ale β -LG în urma tratamentului termic, se observă că o creștere a temperaturii de la 25°C la 90°C a condus la scăderea atât a volumului total, cât și a suprafeței totale ale complexului (**Tabelul 5.6.**).

Tabelul 5.6. Caracteristicile complexului format dintre molecula de β -LG echilibrată la temperaturi de 25°C și 90°C și antocianul CYR

| | 25°C | 90°C |
|---|-----------|-----------|
| Energia de legare (kJ·mol ⁻¹) | -110,71 | -142,21 |
| Energia de atracție van der Waals (kJ·mol ⁻¹) | -69,16 | -88,95 |
| Volumul total al complexului, (Å ³) | 32 845,88 | 32 017,33 |
| Suprafața totală a complexului, (Å ²) | 8 404,63 | 7 866,98 |
| Suprafața totală de interacțiune, (Å ²) | 619,60 | 623,20 |
| Legăturile intermoleculare de hidrogen | - | 5* |

*Legăturile de hidrogen ce stau la baza interacțiunii dintre β -LG și CYR β -LG-CYR implică aminoacizii Lys⁶⁰, Asn⁹⁰, Asn¹⁰⁹ și Ser¹¹⁶.

În ceea ce privește β -LG, au fost sugerate anterior trei situsuri de legare. Datorită volumului mare, molecula de CYR nu poate intra în cavitatea internă a β -LG. Simulările de andocare moleculară la temperaturile 25°C și 90°C, au identificat situsuri de legare al CYR de β -LG, situate pe aceeași parte a moleculei de β -LG și au în comun patru aminoacizi (Leu⁵⁸, Asn⁹⁰, Ile⁷¹ and Met¹⁰⁷) de la o cavitate hidrofobă situată la suprafața proteinei.

În **Tabelul 5.6.** se observă o creștere semnificativă a energiei de legare după echilibrarea proteinei la temperatura de 90°C, comparativ cu temperatura de 25°C. Rezultatele sunt în concordanță cu rezultatele măsurătorilor spectroscopiei de fluorescență ce indică o creștere a afinității dintre β -LG și antociani odată creșterea temperaturii. Energii mai mari *van der Waals*, ce contribuie la totalul energiei de legare, au fost atinse în cazul simulărilor la

temperatura de 90°C, datorită rearanjamentului conformațional al proteinei în jurul situsului de legare al CYR, ceea ce a dus la expunerea unor noi grupări funcționale sau a unor aminoacizi, care fuseseră parțial îngropați în interiorul moleculei în stare nativă. Deși creșterea temperaturii la tratarea preliminară a proteinei a avut ca rezultat o ușoară creștere a ariei totale de interacțiune (de la 619,60 la 623,20 Å²), s-au observat modificări semnificative în aranjamentul aminoacizilor implicați în interacțiunea cu CYR (**Figura 5.17**).

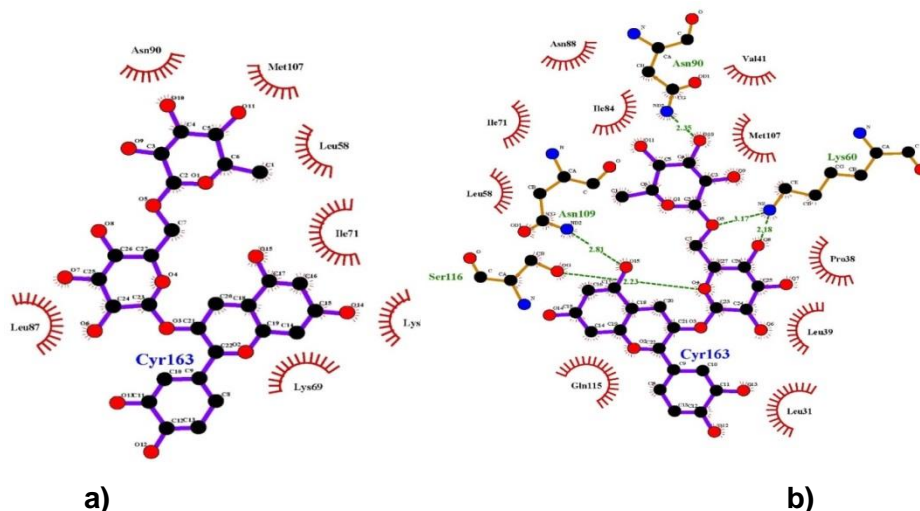


Figura 5.17. Detalii atomice cu privire la interacțiunea dintre CYR și β -LG echilibrate la temperaturile 25°C (a) și 90°C (b). Interacțiunile hidrofobe dintre aminoacizii β -LG aflați în apropierea CYR sunt simbolizate cu arc roșu cu raze îndreptate spre atomul CYR cu care interacționează. Imaginile au fost realizate cu ajutorul soft-ware-ului LigPlot+ (metodă adaptată după [Laskowski și Swindells, 2011](#)).

Unele resturi de aminoacizi nou expuse, și anume Lys⁶⁰, Asn¹⁰⁹ și Ser¹¹⁶, au stabilit legături de hidrogen cu ligandul CYR la distanțe cuprinse între 2,18 și 3,17 Å (**Figura 5.17**), contribuind astfel la stabilizarea complexului β -LG–CYR la tratament termic la temperaturi ridicate. Legătura de hidrogen cu o lungime de 2,35 Å în care este implicat Asn⁹⁰, aminoacid comun celor două situsuri de legare, a fost identificată și la tratamentul β -LG la temperatura de 90°C. Nicio legătură de hidrogen nu contribuie la energia globală de legare în cazul complexului echilibrat la temperatură joasă. La temperaturi ridicate s-a observat o îmbunătățire a contactului stabilit de moleculele de CYR cu aceste resturi amino, prin urmare putem merge pe premiza obținerii unor complexe foarte stabile. În **Figura 5.17**, sunt prezentate detaliile la nivel atomic privind mecanismul de legare al β -LG tratată termic la temperaturile 25°C și 90°C și CYR. Analizând contactele stabilite dintre cele două molecule, se observă că pe lângă restul de Asn⁹⁰, care nu-și modifică poziția și interacțiunile hidrofobe cu ligandul indiferent de valoarea temperaturii de simulare, mai există patru resturi de aminoacizi, Lys⁶⁰, Asn⁸⁸, Asn¹⁰⁹ și Gln¹¹⁵, care sunt implicați în stabilizarea interfeței la temperaturi ridicate.

De asemenea, modificările structurale ale β -LG induse la tratament termic favorizează expunerea unor aminoacizi nepolari, neutri, care, în general, se găsesc în interiorul hidrofob al proteinei. Prin urmare, interacțiunile nepolare în care sunt implicați aminoacizii recent expuși, Leu³¹, Leu³⁹ și Ile⁸⁴, reprezintă o forță motrice pentru legarea ligandului CYR de proteina β -LG tratată termic.

Influența intensității fluorescenței asupra complexului β -lactoglobulină-extract antocianic din pielea de vișine

La lungimea de undă de excitație de 280 nm, atât Tyr și Trp emit fluorescență, în timp ce la 292 nm numai resturile de Trp prezintă fluorescență. În general, fluorescența intrinsecă a proteinelor ce conțin resturi de Tyr și Trp este complexă și depinde de mediul și fotofizica acestor aminoacizi, în special a Trp. Prin urmare, în studiul actual, pentru a obține o imagine

completă a fluorescenței intrinseci a complexului β -LG-EAV, s-au utilizat trei lungimi de undă de excitație pentru a evalua stabilitatea complexului în ceea ce privește intensitatea fluorescenței și lungimile de undă ale maximelor de emisie, și anume: 274 nm, 280 nm și 292 nm. **Figura 5.18.** prezintă modificările structurale ale complexului β -LG-EAV induse la tratament termic și monitorizat prin spectrul de emisie la diferite lungimi de undă de excitație. La temperatura de 25°C, peak-urile de emisie (λ_{max}) ale rezidului hidrofob al β -LG au fost localizate la lungimile de undă de 335 nm, 336 nm și 332 nm, când s-a excitat la lungimile de undă de 274 nm, 280 nm și 292 nm.

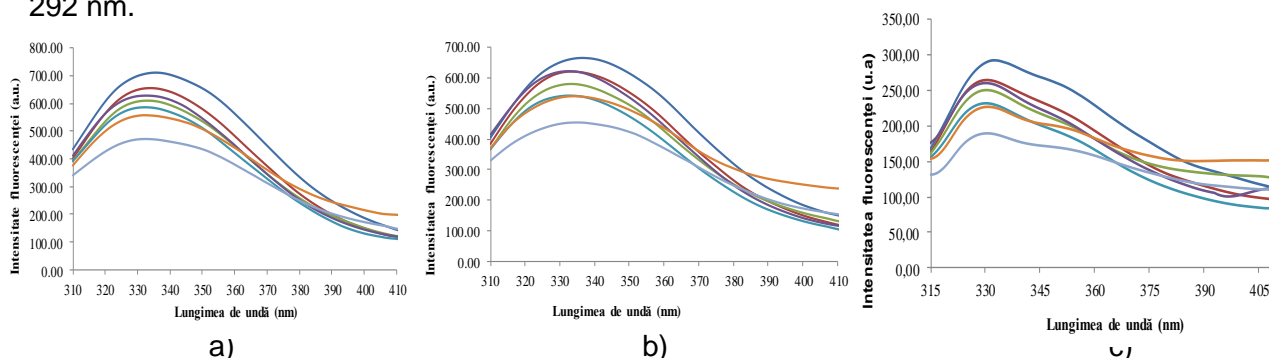


Figura 5.18. Spectrele de emisie ale modificărilor structurale ale complexului β -LG-AEV rezultat în urma excitării la diferite lungimi de undă: 274 nm (a), 280 nm (b) și 292 nm (c)

β -lactoglobulina, în forma nativă, la pH neutru, prezintă un maxim de emisie în jurul valorii de 334 nm (Stănciuc și colab., 2012) în momentul excitării la lungimea de undă de 292 nm. Se observă un *blue-shift* de 2 nm al intensității maxime de emisie, datorat adității de EAV, astfel că au loc modificări conformaționale în structura terțiară a proteinei. Fluorescența intrinsecă a β -LG este dată de restul de Trp¹⁹ localizat în interiorul moleculei, în timp ce restul de Trp⁶¹ este expus solventului iar fluorescența sa este stinsă în totalitate de EAV. Aceasta este posibilă datorită localizării restului de Trp⁶¹ lângă legătura disulfidică (Cys⁶⁶-Cys¹⁶⁰) sau lângă guanidina restului de Arg¹²⁴, ori datorită fenomenului de *self-quenching* cu o altă moleculă de Trp⁶¹ din cadrul altui monomer. Resturile de Tyr⁴² and Tyr¹⁰² sunt îngropate, în timp ce Tyr²⁰ și Tyr⁹⁹ sunt expuse (Liang și Subirade, 2012).

Tratamentul termic a condus la scăderea semnificativă a intensității fluorescenței. În momentul excitării la lungimea de undă de 274 nm, intensitatea maximă a fluorescenței la temperatura de 100°C a scăzut cu aproximativ 34%, comparativ cu tratamentul la temperatura de 25°C (**Figura 5.18.a**). În intervalul de temperatură studiat s-a înregistrat un *blue-shift* în maximul de emisie, de la 335 nm, la temperatura de 25°C, la 332 nm, la temperatura de 100°C, sugerându-se o scădere a polarității în jurul restului de Tyr.

Tratamentul termic până la temperatura de 100°C a condus la scăderea cu 32% (**Figura 5.18.b**) și cu 35% (**Figura 5.18.c**) a intensității fluorescenței, în momentul excitării la lungimea de undă de 280 nm și respectiv 292 nm.

În momentul excitării la lungimea de undă de 280 nm, se observă un *blue-shift* de 3 nm în maximul intensității fluorescenței înregistrat în intervalul de temperatură 50°C și 80°C, urmat de un *red-shift* de 2 nm la temperaturi mai ridicate. În momentul excitării la lungimea de undă de 292 nm, în intervalul de temperatură studiat, s-a înregistrat un *red-shift* de 2 nm. Resturile de Trp și Tyr sunt îngropate în interiorul proteinei când λ_{max} este egal sau mai mic de 330 nm, și expuse solventului când λ_{max} este mai mare de 330 nm.

Fluorescența extrinsecă a complexului β -LG-EAV

Creșterea fluorescenței în prezența ANS evidențiază statutul de moleculă *molten* a proteinelor, în care proteinele pierd cea mai mare parte a structurii terțiare, urmată de apariția unui centru hidrofob accesibil ANS. Fluorescența ANS a complexului β -LG-EAV (ne)tratat

termic s-a măsurat prin excitarea la lungimea de undă de 365 nm, iar spectrul de emisie a fost colectat în domeniul de lungimi de undă de 400 nm și 600 nm. O ușoară creștere a fluorescenței ANS s-a înregistrat la tratament termic la temperaturi de până la 100°C, împreună cu un *blue-shift* de la 519 nm, la temperatura de 25°C și la 517 nm, la temperatura de 60°C, urmat de un *red-shift* de 2 nm în intervalul de temperatură 70-90°C. Majoritatea proteinelor înregistrează un maxim al intensității fluorescenței ANS situat în intervalul 480-490 nm, în timp ce intensitatea ANS-ului liber în soluțiile apoase înregistrează un λ_{max} mult peste 500 nm. Creșterea temperaturii până la 100°C a condus la apariția unui *blue-shift* al fluorescenței ANS de 2 nm, sugerând expunerea resturilor hidrofobe la mediul nepolar. Prin urmare, tratamentul termic de până la temperatura de 90°C conduce la modificări conformaționale ce au ca rezultat o structură mai flexibilă a proteinei din complex, în care regiunile hidrofobe ce erau inițial îngropate în interiorul proteinei devin expuse și accesibile pentru legarea cu ANS.

Diagrama de faze

În **Figura 5.19**, este prezentată diagrama de fază a complexului β -LG-EAV obținută prin reprezentarea intensității fluorescenței la lungimea de undă de 320 nm, în funcție de intensitatea obținută la lungimea de undă de 365 nm, la diferite valori de temperatură.

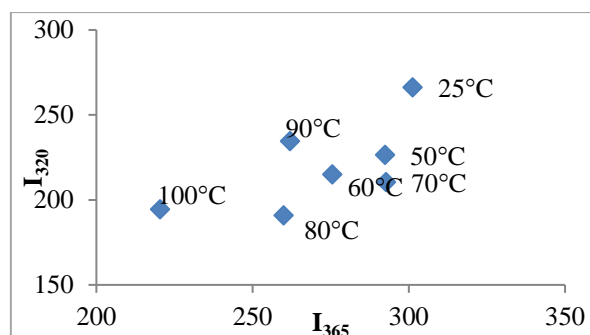


Figura 5.19. Diagrama de faze a complexului β -LG-EAV, prin reprezentarea intensității fluorescenței la lungimea de undă 320 nm, în funcție de intensitatea obținută la lungimea de undă de 365 nm, la diferite valori de temperatură. Valorile temperaturii sunt indicate în vecinătatea simbolurilor.

Nelinearitatea corelației sugerează o tranziție *three-state* între o serie de conformații structural distincte. La valori de pH neutru, disocierea dimerului este cuplată cu tranziția conformațională către forma R, în jurul temperaturii de 40-55°C. Tranziția de la forma nativă N a proteinei la forma R a fost determinată de o singură grupare carboxil, care în forma N este îngropată în interiorul hidrofob al proteinei, iar în conformația R devine expusă (Seo și colab., 2010). O dată cu creșterea temperaturii tratamentului termic s-a observat o pierdere a structurii β -sheet, în timp ce în jurul valorii de 65°C s-a observat o pierdere bruscă a conformației helicale. Stănciuc și colab. (2012) au arătat că deplierea β -LG este un proces în două etape, care implică distrugerea ireversibilă a structurii terțiare unice în prima etapă, urmată de denaturarea structurii secundare în cea de a doua etapă. La temperatura de 90°C a fost sugerată și formarea de noi lanțuri proteice asemănătoare cu forma nativă a β -LG, cum ar fi structuri de β -sheets și β -turns antiparalele.

Spectrele sincron ale complexului β -LG-EAV

Spectrele sincron ale complexului β -LG-EAV au fost monitorizate prin scanarea simultană a monocromatoarelor de excitație și emisie prin menținerea unei valori fixe a diferenței dintre lungimilor de undă la excitație și emisie ($\Delta\lambda$). Scopul acestei tehnici este acela de a investiga natura micromediului din vecinătatea grupărilor fluorofore din complex în timpul tratamentului termic. Caracteristicile micromediului resturilor de Tyr și Trp sunt obținute la $\Delta\lambda$ de

15 nm și respectiv 60 nm. Spectrele sincron la diferite temperaturi ale complexului pentru $\Delta\lambda$ 15 și 60 nm sunt prezentate în **Figura 5.20. a și b**.

Shift-urile în poziția λ_{max} denotă modificări în polaritatea din jurul resturilor cromofore. Adăugarea EAV a determinat un *blue-shift* în λ_{max} de la 300 la 274 nm în cazul Tyr, și de la 280 nm la 275 nm în cazul Trp, indicând faptul că situsurile de legare sunt situate în proximitatea resturilor de Tyr și Trp, inducând modificarea conformației în microvecinătatea acestora (Aprodu și colab., 2017).

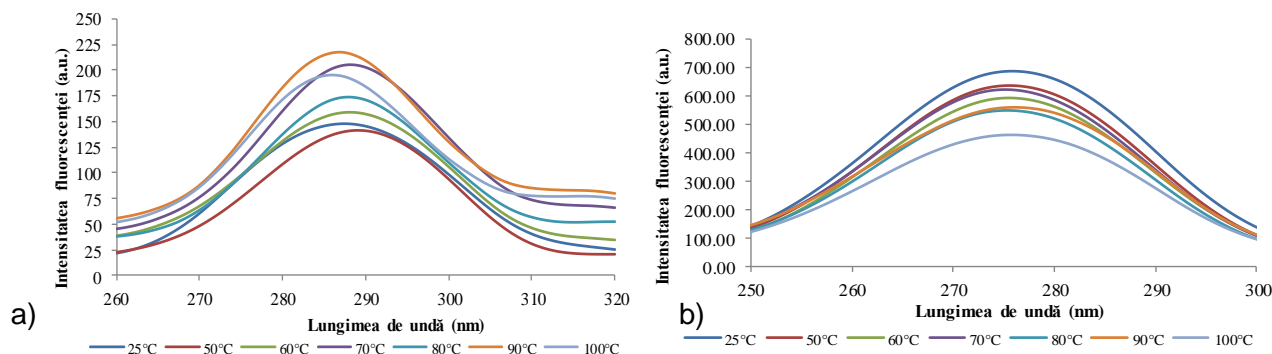


Figura 5.20. Spectrele sincron ale complexului β -LG-EAV la $\Delta\lambda = 15$ nm (a) și $\Delta\lambda = 60$ (b) nm după tratamentul termic la diferite temperaturi

Complexul β -LG-EAV a înregistrat un *red-shift* semnificativ de 15 nm în λ_{max} la $\Delta\lambda$ de 15 nm și la temperatura de 50°C, în timp ce creșterea temperaturii până la 100°C a condus la apariția unui *blue-shift* de 3 nm (**Figura 5.20. a**). În **Figura 5.20. b**, la temperaturi mai mari de 90°C se observă un *red-shift* de 1 nm pentru restul de Trp. Prin urmare, putem concluziona că tratamentul termic conduce la modificări conformaționale cu expunerea restului de Tyr la temperaturi scăzute și expunerea parțială a restului de Trp la temperaturi ridicate.

Spectroscopia de fluorescență tridimensională

Modificările în spectrul fluorescenței tridimensionale ale complexului β -LG-EAV sunt prezentate în **Tabelul 5.7**. Peak-ul A reprezintă un peak de împrăștiere Raleigh (Raleigh scattering peak) ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$), în timp ce peak-ul 2 evidențiază caracteristicile spectrale ale resturilor de Trp și Tyr. Peak-ul 1 reflectă caracteristicile structurii de bază polipeptidice, în timp ce peak-ul B reprezintă un peak de împrăștiere (Scattering peak) ordinul doi ($\lambda_{em} = 2 \lambda_{ex}$).

După cum se poate observa în **Tabelul 5.7.**, intensitatea fluorescenței al peak-ului 1 în spectrul 3D al complexului se modifică semnificativ comparativ cu peak-ul 2, mai ales la temperaturi ridicate. Scăderea intensității peak-ului 2 evidențiază o creștere a polarității în jurul resturilor de Trp și Tyr și o scădere a expunerii unor regiuni hidrofobe. Apariția fenomenului de *blue-shift* în λ_{max} demonstrează că tratamentul termic induce plierea lanțurilor polipeptidice.

Tabelul 5.7. Caracteristicile spectrale ale complexului β -LG-EAV la diferite temperaturi

| Temperatura, °C | Peak 1 | | | Peak 2 | | |
|--------------------|---|---|---|---|---|---|
| | Poziția Peak-ului ($\lambda_{ex}/nm, \lambda_{em}/nm$) | Stokes shift $\Delta\lambda$ (nm) | Intensitatea fluorescenței (u.a.) | Poziția Peak-ului ($\lambda_{ex}/nm, \lambda_{em}/nm$) | Stokes shift $\Delta\lambda$ (nm) | Intensitatea fluorescenței (u.a.) |
| 25 | 230/333 | 103 | 903,88±86,20 | 280/337 | 57 | 641,00±41,06 |
| 50 | 230/332 | 102 | 949,60±72,12 | 280/333 | 53 | 606,54±47,35 |
| 60 | 230/332 | 102 | 891,90±57,19 | 280/335 | 55 | 562,08±3,98 |

Compozite funcționale pe bază de proteine din zer și extracte vegetale din fructe roșii

| | | | | | | |
|-----|---------|-----|--------------|---------|----|--------------|
| 70 | 230/330 | 100 | 842,58±1,66 | 280/333 | 53 | 513,99±13,83 |
| 80 | 230/331 | 101 | 782,70±37,93 | 280/332 | 52 | 486,71±42,90 |
| 90 | 230/330 | 100 | 541,73±28,45 | 280/334 | 54 | 499,99±8,10 |
| 100 | 230/326 | 96 | 355,25±11,71 | 280/334 | 54 | 448,15±27,47 |

Experimente de quenching

Aceste experimente au fost realizate pentru monitorizarea modificărilor conformaționale induse de tratamentul termic în complexul α -LG-EAV.

Experimentele de quenching s-au realizat prin adăugarea secvențială de acrilamidă sau KI la soluțiile de complex tratate termic, la diferite temperaturi. Acrilamida și KI sunt quencheri externi utilizați pentru investigarea accesibilității la solvent și a polarității micromediului adiacent resturilor de Trp.

Acrilamida blochează resturile de Trp expuse și parțial expuse, în timp ce KI blochează doar fluorescența resturilor de Trp expuse la solvent.

În cazul ambilor quencheri, intensitatea fluorescenței complexului scade cu creșterea concentrației de quencher.

Toate corelațiile Stern-Volmer au fost liniare, valorile constantelor de quenching (K_{SV}) ale complexului fiind prezentate în **Tabelul 5.8**. Pentru ambii *quencheri* valorile K_{SV} nu au fost diferite din punct de vedere statistic ($p > 0,05$).

Cu toate acestea, în cazul acrilamidei s-a înregistrat o creștere bruscă a intensității fluorescenței, la temperatura de 50°C, urmată de o ușoară descreștere a IF la temperaturi mai mari (**Tabelul 5.8**), fenomen ce poate fi atribuit faptului că restul de Trp devine mai puțin accesibil acrilamidei, prin urmare putem afirma că accesibilitatea restului de Trp se modifică semnificativ odată cu încălzirea la temperatura de 50°C.

Tabelul 5.8. Constantele Stern-Volmer (K_{SV}) ale complexului β -LG-EAV la diferite temperaturi

| Temperatura, °C | $K_{SV}(10^{-3}L \cdot mol^{-1})$ | |
|-----------------|-----------------------------------|-----------|
| | Acrilamidă | KI |
| 25 | 6,82±0,58 | 2,38±0,68 |
| 50 | 7,11±0,32 | 1,68±0,34 |
| 60 | 6,41±0,50 | 2,49±0,21 |
| 70 | 5,75±0,42 | 3,48±0,18 |
| 80 | 6,23±0,28 | 3,12±0,28 |
| 90 | 5,50±0,23 | 2,08±0,19 |
| 100 | 5,87±0,63 | 1,64±0,12 |

5.2.4. Concluzii parțiale

Obiectivul principal al studiului în această etapă a fost acela de a studia interacțiunea dintre antocianii din extractul din pieliță de vișine și principala proteină din zer, care determină comportamentul tehnologic și funcțional al acestora, utilizând experimente de quenching și metode de andocare moleculară.

Complementaritatea celor două metode de investigație a permis previzionarea unor parametri de legare și a unor evenimente moleculare cu importanță deosebită, din perspectiva

elucidării și selectării condițiilor optime ale microîncapsulării componentelor selectate și dezvoltării de compozite cu funcționalitate ridicată, pentru utilizări în produse alimentare funcționale, nutraceutice, cosmeceutice etc.

În stare nativă, legarea antocianilor din extractul din pielită de vișine și formarea complexului antociani - β -lactoglobulină a fost pus în evidență printr-un red-shift de 75 nm, la lungimea de undă la care se înregistrează maximul de intensitate (λ_{max}), în timp ce tratamentul termic nu a influențat semnificativ structura proteinei din perspectiva afinității antocianilor, înregistrându-se red-shift-uri de 78 nm și 76 nm.

Rezultatele obținute au permis emiterea ipotezei referitoare la polaritatea mediului adiacent resturilor de Trp din lanțurile polipeptidice, care devin mai expuse solventului hidrofili, datorită interacțiunii dintre moleculele proteice și cele de antociani.

Au fost estimate constantele K_{SV} , cea mai mică valoare înregistrându-se la temperatura de 100°C ($0,23 \pm 0,03 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), iar cea mai mare la temperatura de 80°C ($0,59 \pm 0,15 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), sugerând un grad mai mare de expunere a resturilor de Trp odată cu creșterea temperaturii până la temperatura de 80°C și o scădere a gradului de expunere la valori mai mari de temperatură.

Valorile K_{SV} sugerează o flexibilitate moleculară mai mare la temperatura de 80°C, care scade odată cu creșterea temperaturii, datorită asocierii moleculelor proteice, fapt care limitează accesibilitatea antocianilor prin blocarea parțială a situsurilor de legare.

Au fost estimate valorile constantelor aparente de legare (K_a) și numărul locurilor de legare (n) la diferite temperaturi, unde nu sunt semnificativ diferite în intervalul de temperatură studiat ($p > 0,05$), variind între $1,25 \pm 0,22 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ la 25°C la $1,18 \pm 0,16 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$, la temperatura de 100°C. Valoarea numărului situsurilor de legare, n a fost mai mică decât 1, sugerând prezența a cel puțin unui situs de legare a antocianilor la moleculele de proteină. S-a remarcat o creștere a valorii n la temperatura de 100°C, de la $0,60 \pm 0,11$ la $0,88 \pm 0,03$, indicând creșterea afinității β -LG pentru antocianii din extractul din pielită de vișine.

Parametrii termodinamici calculați au evidențiat implicarea forțelor hidrofobe în formarea complexului dintre β -lactoglobulină - antociani la temperaturi ridicate.

Abordarea *in silico* a fost utilizată pentru a investiga la nivel molecular influența tratamentului termic asupra abilității proteinei β -lactoglobulină de a lega molecula de cianidin-rutinozid, compus identificat prin cromatografie ca fiind antocianul predominant în extractul din pielită de vișine. Particularitățile și afinitățile dintre moleculele de β -lactoglobulină și de cianidin-rutinozid au fost verificate pe modelele de asamblare, rafinate, de nivel înalt, după ce au fost efectuate simulările de andocare moleculară.

Indiferent de temperatura simulată, structura secundară a β -lactoglobulinei a fost bine conservată la interacțiunea cu antocianul cianidin-rutinozid. Astfel, rezultatele au demonstrat că în intervalul de temperatură 25-90°C, cantitatea de aminoacizi implicați în lanțul proteic al β -lactoglobulinei (26,6-29,7%) a fost mai mare decât lanțul elicoidal (7-9,5%). Datorită fenomenelor de pliere ale β -lactoglobulinei în urma tratamentului termic, se observă că o creștere a temperaturii de la 25°C la 90°C a condus la scăderea atât a volumului total, cât și a suprafeței totale ale complexului.

În plus, rezultatele obținute prin andocare moleculară la temperaturile 25°C și 90°C au identificat situsurile de legare ale cianidin-rutinozidului, situate pe aceeași parte a moleculei de β -lactoglobulină, care au în comun patru aminoacizi (Leu⁵⁸, Asn⁹⁰, Ile⁷¹ and Met¹⁰⁷) de la o cavitate hidrofobă situată la suprafața proteinei.

În continuare, studiile au vizat evaluarea stabilității la procesarea termică a complexului β -lactoglobulină - extract antocianic din pielită de vișine prin evaluarea proprietăților de fluorescență, utilizând o combinație de metode, cum ar fi fluorescența intrinsecă și extrinsecă, diagrama de faze, spectre sincron și spectre 3D.

Evaluarea influenței tratamentului termic asupra fluorescenței intrinseci a complexului s-a caracterizat printr-o succesiune de blue și red-shift-uri în funcție de temperatură, care evidențiază specii moleculare diferite ale proteinei. În general, s-a apreciat că fenomenul de scădere a intensității fluorescenței intrinseci împreună cu fenomenele de *blue-shift* înregistrate în maximum de emisie pot fi explicate prin efectul tratamentului termic la temperaturi ridicate asupra agregării proteinei cu formare de legături intermoleculare.

Fluorescența extrinsecă a complexului a evidențiat modificări conformaționale ce au ca rezultat o structură mai flexibilă a proteinei din complex, în care regiunile hidrofobe ce erau inițial îngropate în interiorul proteinei devin expuse și accesibile pentru legarea cu moleculele hidrofobe.

Complexitatea influenței tratamentului termic asupra speciilor moleculare proteice a fost pusă în evidență prin intermediul diagramei de faze, care a evidențiat un proces de depliere a β -lactoglobulinei în două etape, primul implică distrugerea ireversibilă a structurii terțiare unice, în timp ce al doilea implică denaturarea structurii secundare.

A fost sugerată formarea de noi lanțuri proteice asemănătoare cu forma nativă a β -lactoglobulinei, cum ar fi structuri de β -sheets și β -turns antiparalele, la temperatura de 90°C.

Spectrele sincron ale complexului au permis monitorizarea caracteristicilor micromediului resturilor de Tyr și Trp, fiind evidențiate shift-uri în poziția λ_{max} , asociate cu modificări în polaritatea din jurul resturilor cromofore. Spectrele sincron au evidențiat faptul că situsurile de legare sunt situate în proximitatea resturilor de Tyr și Trp, inducând modificarea conformației în microvecinătatea acestora.

Spectrele 3D au evidențiat impactul tratamentului termic asupra plierii lanțurilor polipeptidice.

Au fost testate și calculate constantele de legare pentru acrilamidă și iodură de potasiu, nefiind înregistrate diferențe semnificative între valori odată cu creșterea temperaturii. Valorile obținute cu acrilamidă au fost mai mari comparativ cu cele obținute cu KI, fapt datorat accesibilității acrilamidei și capacității acrilamidei de a bloca resturile de Trp expuse și parțial expuse, în timp ce KI blochează doar fluorescența resturilor de Trp expuse la solvent.

Studiul are un caracter de cercetare fundamentală, care prezintă potențial de aplicabilitate practică prin elucidarea mecanismelor de legare dintre compușii biologic activi și matricile proteice, din perspectiva aplicării unor procese de stabilizare, protecție și eliberare controlată, cum ar fi microîncapsularea, și dezvoltarea de compozite pe bază de proteine și extracte vegetale cu valoare adăugată, cu potențiale aplicații în industrie.

5.3. Ingrediente funcționale obținute prin microîncapsularea antocianilor din extractul de vișine utilizând proteinele din zer drept matrice de încapsulare

5.3.1. Aspecte generale

Obiectivul acestui studiu a fost microîncapsularea antocianilor din extractul de vișine prin liofilizare, utilizând ca materiale încapsulante izolatul proteic din zer și guma acacia. Pudra a fost caracterizată privind eficiența încapsulării, cantitatea de fitocompuși, culoare, activitate antioxidantă, microstructura capsulelor și digestibilitatea *in vitro*. S-a urmărit de a se elucidă fezabilitatea încapsulării antocianilor din extractul de vișine (AEV) folosind proteina β -lactoglobulina (β -LG) ca agent de încapsulare, în diferite forme. Microparticulele obținute au fost analizate pentru a demonstra conținutul în antociani, eficiența încapsulării și modificările de culoare. Microstructura particulelor a fost caracterizată prin microscopie confocală. Spectroscopia FT-IR a fost utilizată ca tehnică complementară pentru studiul modificărilor din structura secundară a β -LG în condițiile experimentale testate. Funcționalitatea microparticulelor a fost demonstrată prin analiza activității antioxidante, a activității antimicrobiene și a digestibilității *in vitro*.

5.3.2. Materiale și metode

Reactivi

β -LG din lapte de bovine (de puritate 90%, variante genetice A și B), acidul 1-anilin-8-naftalensulfonic (ANS), acrilamida și iodura de potasiu (KI) au fost achiziționate de la Sigma (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO). Transglutaminaza (TG) microbială (Activa™ TG) din *Streptovercillium mobaraense* a fost achiziționată de la Ajinomoto Corporation Inc. (Tokyo, Japan). Activitatea enzimei a fost 100 U/g proteină.

Izolatul proteic din zer (IPZ) (conținut în proteine de 90%) a fost achiziționat de la compania Fonterra (New Zealand). Guma acacia (GA), 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil-ul (DPPH), acidul 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilic (Trolox), reactivul Folin-Ciocalteu, carbonatul de sodiu, hidroxidul de sodiu, acetatul de sodiu, nitritul de sodiu, clorura de potasiu, clorura de aluminiu, acidul galic, persulfat de potasiu, acidul formic, etanolul și metanolul au fost achiziționate de la Sigma Aldrich Steinheim, Germania.

5.3.3. Rezultate și discuții

Caracterizarea fitochimică a extractului etanolic din pielea de vișine

Înainte de microîncapsulare, extractul din pielea de vișine a fost caracterizat fizic și chimic, conform **Tabelului 5.9**.

Tabelul 5.9. Compoziția fitochimică și caracterizarea fizico-chimică a extractului din pielea de vișine

| Conținutul de zahăr (°Brix) | pH | CPT (mg EAG/100 g s.u) | CAM (mg C3G/100 g s.u) | CFT (mg EC/100 g s.u) | Activitatea antioxidantă (μmol TE/g s.u) |
|-----------------------------|-----------|------------------------|------------------------|-----------------------|--|
| 4,2 | 2,89±0,05 | 285,04±1,55 | 10,95±0,07 | 198,05±7,61 | 480,23±0,15 |

Extractul din pielea de vișine a fost caracterizat privind conținutul fitochimic. Conținutul de antociani monomerici a fost de 33,56±0,73 mg C3G/100 g s.u., conținutul de polifenoli totali, de flavonoide totale și activitatea antioxidantă au fost de 198,23±19,47 mg EAG/100 g su, 122,72±2,55 mg EC/100 g su respectiv 81,62±2,39% (471,49±0,92 μmol TE/mg s.u.). Valorile obținute prin analiza microcapsulelor sunt: 31,95±0,65 mg C3G/100 g s.u. pentru CAM, 5,82±0,26 mg EAG/100 g s.u. pentru CPT, 3,58±0,73 mg EC/100g s.u. pentru CFT și 480,58±1,84 μmol TE/mg s.u., pentru activitatea antioxidantă.

Evaluarea eficienței încapsulării polifenolilor

Eficiența încapsulării (EÎ) este legată de asemenea de stabilitatea biochimică a antocianilor în pudră. Toate probele experimentale au avut un conținut antociani în cantitate de 0,13 ECG/g pudră și 0,14 ECG g per gram pudră. Eficiența încapsulării (EÎ) a fost de 54,14% pentru proba **P1**, 44,79% pentru proba **P2** și 64,69% pentru proba **P3**, cu o productivitate a microîncapsulării de 64,24%, 67,97% și 70,22%. Prin urmare, reacțiile de reticulare par să îmbunătățească EÎ antocianilor din vișine, în timp ce în starea depliată (P2), β -LG a arătat cea mai mică valoare a EÎ.

Transglutaminaza (TG) microbială este adesea utilizată pentru îmbunătățirea proprietăților de textură și gelifiere a proteinelor, inclusiv proteina din zer ([Qin și colab., 2016](#)). Enzima este independentă de prezența Ca^{2+} și catalizează transferul grupărilor acil între grupările γ -hidroxilamină ale restului de glutamină (Gln) și grupările ϵ -amino ale resturilor de lizină, cu formarea unei legături covalente ϵ -(γ -glutamil) lizin izopeptid, conducând la reticularea inter- sau intramoleculară ([Ramirez-Suarez și Xiong, 2006](#)). Prin urmare, este posibil ca tratamentul cu TG să faciliteze formarea de legături S-S și interacțiuni hidrofobe, ceea ce a condus formarea unei rețele mai dense și omogene în interiorul microparticulelor. Toate probele

au prezentat valori semnificative pentru EÎ, sugerând că β -LG poate avea un rol semnificativ ca agent de încapsulare a compușilor bioactivi din vișine.

Caracterizarea eficienței încapsulării antocianilor în matricea proteică

Eficiența încapsulării a fost de $70,3 \pm 2,2\%$. Diferite studii au demonstrat că interacțiunile de tipul proteină-compuși fenolici reprezintă rezultatul mai multor legături, cum ar fi hidrofobe, electrostatice, van der Waals și de hidrogen (Prigent și colab., 2003).

Analiza FT-IR a compușilor biologic activi din extract și microparticule

În acest studiu, utilizând tehnica ATR (Figura 5.21.), structura secundară a β -LG în prezența extractului de vișine a fost previzionată din spectrele derivate, folosind metoda lui Goormaghtigh și colab., (2009).

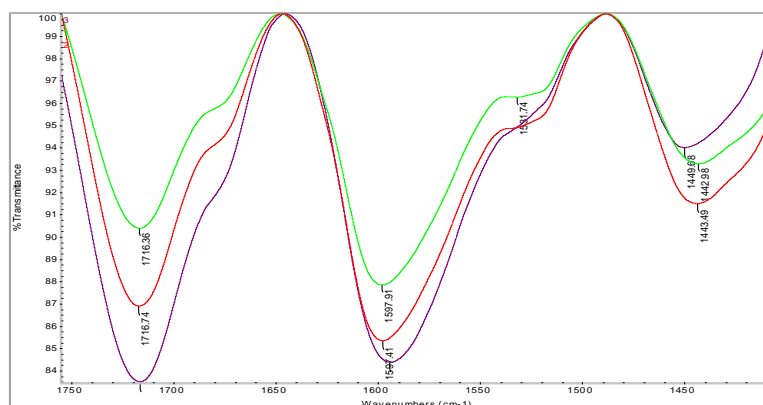


Figura 5.21. Spectrele ATR ale microparticulelor (β -LG cu extract de vișine: 1 – P1, 2 – P2, 3 – P3)

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 5.10. Comparativ cu probele netratate (P1), componenta β -sheet crește ușor datorită tratamentului termic în proba P2, și semnificativ în cazul probei P3. Formarea structurilor β -sheet în detrimentul structurilor α -helix a fost analizată (Eissa și colab., 2006).

Tabelul 5.10. Structura secundară previzionată a β -LG în microparticule

| Structura secundară | P 1 (%) | P 2 (%) | P 3 (%) |
|---------------------|------------------|------------------|------------------|
| α -helix | 23,82 \pm 1,45 | 20,02 \pm 1,30 | 18,97 \pm 1,16 |
| β -sheet | 33,01 \pm 2,60 | 33,94 \pm 2,68 | 34,70 \pm 2,82 |
| β -turns | 20,10 \pm 0,70 | 20,58 \pm 0,72 | 19,66 \pm 0,68 |
| random | 23,04 \pm 1,91 | 25,44 \pm 2,11 | 26,65 \pm 2,21 |

Cu toate acestea, variația relativ redusă între probe indică replierea lanțurilor polipeptidice.

Evaluarea structurii și morfologiei microparticulelor

Microscopia confocală cu scanare laser (CLSM) permite utilizatorului să descrie și să identifice toți compușii marcați fluorescent la rezoluția de microscopie optică fără a avea ambiguități. Imaginile generate de microscopul confocal specific probelor care conțin extract din pielă de vișine sunt prezentate în Figura 5.22. C4. Aparent, nanoparticulele mici de β -LG (0,1-0,2 μ m) par a fi distribuite într-o rețea omogenă (C1), similar cu observațiile lui Rafe și colab. (2012).

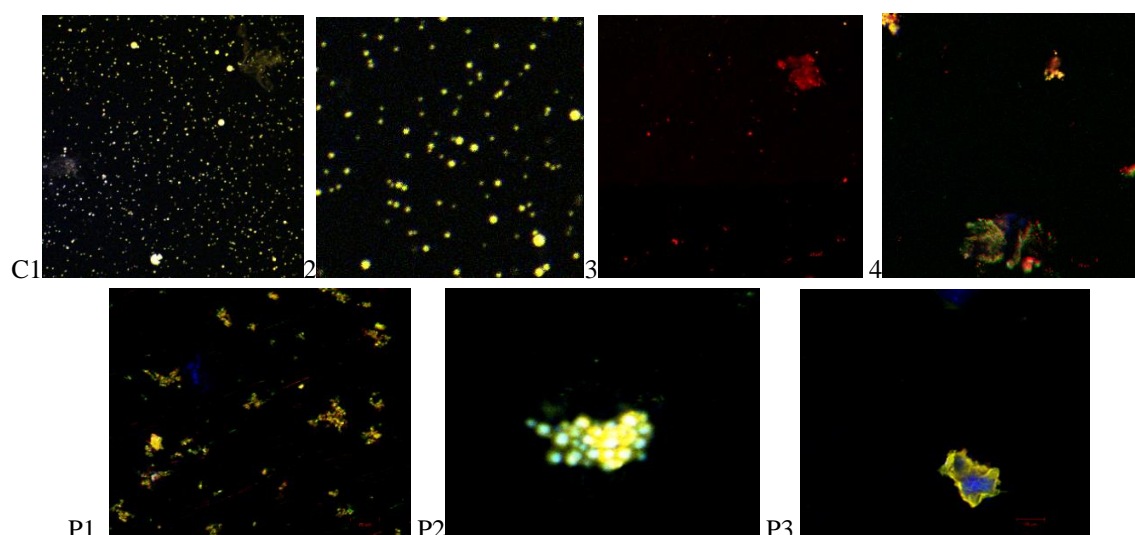


Figura 5.22. Imaginile generate de CLSM ale probelor control: C1 - β -LG, C2 – β -LG tratată termic, C3 - β -LG cu TG, C4 – extract din pieliță de vișine și probele experimentale: P1, P2, P3

Tratamentul termic la temperatura de 70°C a determinat agregarea β -LG în agregate mari (**C2**). Mărimea medie a particulelor de β -LG este raportată a fi în intervalul de 98-192 nm, fiind corelată pozitiv cu temperatura de încălzire ([Ha și colab., 2015](#)). Atunci când extractul de vișine s-a încapsulat în β -LG, fluorescența a confirmat prezența acestor compuși în interiorul proteinei (**P1**). Moleculile de proteine au fost grupate în grupuri mari și compacte care pot fi observate în cazul **P2**, împreună cu fluorescența compușilor bioactivi distribuite în microparticule β -LG. În cazul probei **P1**, mărimea agregatelor obținute după liofilizare s-a determinat la 10-20 μ m (**Figura 5.22. P1**). Agregate mai mari (20-40 μ m) s-au observat în cazul probelor **P2** și **P3**, datorită agregării și reticulării moleculelor proteice.

Analiza morfologică a microcapsulelor

Datorită proprietăților de autofluorescență, s-a observat că pudra nativă cu extract de vișine încapsulat în IPZ-GA formează un film subțire ce delimitează cavități largi (20-80 μ m), așa cum se poate observa în **Figura 5.23. a**. Metoda de uscare prin liofilizare reprezintă o soluție viabilă pentru protecția antocianilor din extractul de vișine (AEV) în amestec de IPZ-GA, prin formarea de particule cu suprafețe netede și poroase, cu dimensiuni de 1-3 μ m (**Figura 5.23. b**). Aceste microcapsule sunt aglutinate în coacervate mari, cu dimensiuni cuprinse între 30-50 μ m (**Figura 5.23. b**). Mai mult, pe lângă metoda de uscare prin liofilizare, complexul format AEV-IPZ-GA a fost obținut și prin metoda de uscare prin pulverizare, iar acele microcapsule au fost foarte stabile la condițiile de mediu (căldură, oxigen, lumină) și au prezentat o stabilitate la procesare și depozitare ([Robert și Fredes, 2015](#)).

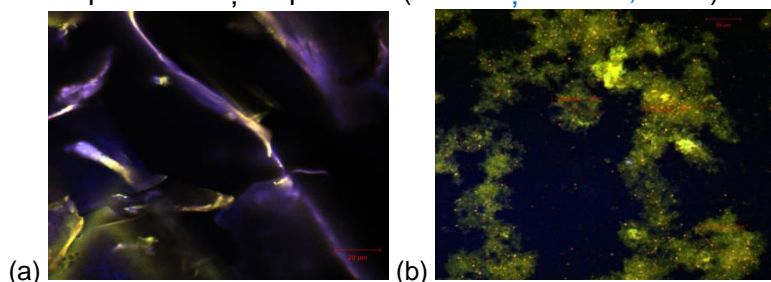


Figura 5.23. Imagini ale microcapsulelor EAV-IPZ-GA analizate cu microscopul confocal. Probe în stare nativă (a) sau colorată (b)

Studiul parametrilor de culoare ai extractului și a microparticulelor

Datele referitoare la culoarea celor trei probe sunt prezentate în **Tabelul 5.11**.

Tabelul 5.11. Parametrii de culoare ai probelor cu antociani microîncapsulați

| Probe | L | a* | b* | Indicele Hue | Chroma |
|-----------|------------|-----------|------------|--------------|------------|
| P1 | 84,47±0,40 | 9,10±0,41 | 9,40±0,20 | 0,80±0,01 | 13,09±0,43 |
| P2 | 87,64±1,01 | 6,13±0,37 | 10,16±0,64 | 0,90±0,05 | 9,84±1,09 |
| P3 | 85,96±0,47 | 7,68±0,52 | 8,11±0,22 | 0,67±0,01 | 13,00±0,64 |

În ceea ce privește valoarea *L*, nu au fost înregistrate diferențe semnificative între probe ($P > 0,05$), sugerând astfel că agentul de încapsulare nu a avut un efect semnificativ asupra culorii de suprafață a pudrelor. Acest lucru poate fi explicat prin stabilitatea matricei în timpul procesului de liofilizare din cauza unei protecții adecvate a materialelor de bază, ceea ce conduce la creșterea cantității de material încapsulat pe suprafața particulelor. Valorile *a** au fost caracteristice culorii roșii în **P1**, indicând că încapsularea antocianilor în β -LG a prezentat o valoare de roșu mai mare comparativ cu probele **P2** și **P3**. Cea mai mare cantitate de galben a corespuns probei **P2**. Proba **P3** a prezentat valoarea indicelui *Hue* cea mai mică ($0,67 \pm 0,01$), urmată de **P1** ($0,80 \pm 0,01$) și **P2** ($0,90 \pm 0,05$). Prin urmare, toate probele au avut valori indicelui *Hue* apropiate de valoare roșu pur. Valoarea cea mai mare pentru *Chroma* a fost determinată pentru probele **P1** și **P3**, și cea mai mică pentru **P2** (Tabelul 5.11.).

Studiul parametrilor de culoare a microcapsulelor

Datele referitoare la culoarea microcapsulelor sunt prezentate în Tabelul 5.12.

Tabelul 5.12. Parametrii de culoare ale microcapsulelor

| Parametrii | <i>L*</i> | <i>a*</i> | <i>b*</i> | Indicele Hue | Chroma |
|--------------|------------|------------|------------|--------------|------------|
| Pudra | 74,87±0,29 | 19,27±0,19 | -2,84±0,04 | -6,75±0,08 | 19,48±0,19 |

După cum se poate observa, valoarea mare a parametrului *a** indică o culoare roșu predominantă a microcapsulelor, iar valoarea mică a parametrului *b** dar și valoarea negativă a lui *Hue* ($-6,75 \pm 0,08$) demonstrează că pudra microîncapsulată este aproape de culoarea roșu pur.

Activitatea antioxidantă a microparticulelor

Extractul a prezentat o activitate antioxidantă de $75,35 \pm 0,23\%$ ($480,23 \pm 0,15 \mu\text{mol TE/g s.u.}$), în timp ce microîncapsularea a determinat o scădere a activității antioxidante cu DPPH-RSA, pentru proba **P1** de $70,33 \pm 0,33\%$ ($474,20 \pm 0,25 \mu\text{mol TE/g s.u.}$), $73,21 \pm 1,76\%$ ($473,23 \pm 0,58 \mu\text{mol TE/g s.u.}$), pentru proba **P2**, și $64,56 \pm 0,33\%$ ($476,10 \pm 0,11 \mu\text{mol TE/g s.u.}$), în cazul probei probei **P3**.

Digestibilitatea *in vitro* a compușilor bioactivi microîncapsulați

Digestibilitatea antocianilor microîncapsulați în condiții gastrice și intestinale, în cele trei condiții experimentale sunt prezentate în Figura 5.24. a și b.

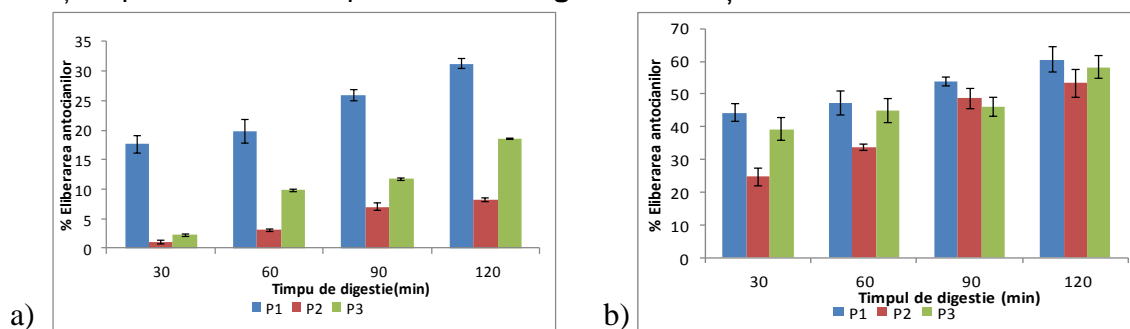


Figura 5.24. Digestibilitatea antocianilor microîncapsulați în condiții gastrice (a) și intestinale (b)

Eliberarea antocianilor a fost limitată în timpul digestiei gastrice, ceea ce sugerează că proteina poate fi folosită pentru a proteja antocianii în stomac, permițând o posibilă eliberare a

compușilor biologic activi în intestin. Așa cum se poate observa din **Figura 5.24. a**, digestia microparticulelor a fost favorizată în cazul probei **P1**, cu un maxim de eliberare de $31,27 \pm 0,81\%$. Digestia în cazul probei **P2** a fost limitată, cu un maxim de eliberare de $8,20 \pm 0,26\%$, după 120 minute de reacție. Prin urmare, aceste rezultate au arătat că tratamentul termic a indus agregarea moleculelor de β -LG, care au devenit mai puțin sensibile la hidroliza peptică.

Cu toate acestea, rezultatele au indicat că antocianii încapsulați sunt foarte stabili și nu sunt eliberați din sistemele încapsulate sub acțiunea pepsinei. În timpul digestiei gastrice (2 ore), aproximativ 70% din antocianii încapsulați în proba **P1**, peste 90% în proba **P2** și peste 80% din proba **P3** au fost reținute în interiorul microparticulelor.

Rezultatele obținute din digestia gastrică au fost analizate în digestia intestinală (**Figura 5.24. b**), și au arătat că antocianii din proba **P1** au fost hidrolizați mai rapid de pancreatină, după 120 minute, comparativ cu probele **P2** și **P3**.

Digestibilitatea *in vitro* a microcapsulelor

Figura 5.25. prezintă rezultatele și cinetica digestiei microparticulelor.

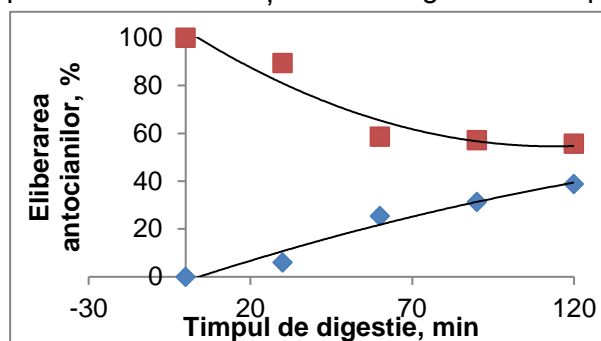


Figura 5.25. Eliberarea *in vitro* a antocianilor microîncapsulați în amestec de izolat proteic din zer și gumă acacia (♦ suc gastric simulat, ■ suc duodenal)

În sucul gastrointestinal simulat (SGS), eliberarea a atins valoarea maximă de 39% după 120 de minute de reacție.

Conform datelor prezentate în **Figurii 5.25.** la finalul digestiei, cantitatea de antociani a scăzut cu aproximativ 45%, după 120 minute de reacție.

Prin urmare, pe lângă beneficiile cunoscute ale proteinelor din zer, acestea pot atenua stresul oxidativ postprandial în întreg tractul gastro-intestinal.

5.3.4. Concluzii parțiale

Scopul studiului prezentat în acest capitol a fost acela de a testa posibilitatea obținerii de compozite funcționale prin microîncapsularea antocianilor din extractul din pieliță de vișine, utilizând β -lactoglobulina ca material de încapsulare, în diferite forme moleculare și testarea unor proprietăți funcționale și biologice ale pudrelor rezultate.

S-a studiat microîncapsularea antocianilor din extractul din pieliță de vișine prin liofilizare, utilizând ca materiale încapsulante izolatul proteic din zer și guma acacia, din perspectiva optimizării tehnologiei de obținere a compozitelor funcționale pe bază de proteine din zer și extracte din fructe roșii.

A fost testată capacitatea proteinei de a microîncapsula antocianii din extractul din pieliță de vișine în forma nativă (P1), în forma denaturată termic (P2) și în forma reticulată (P3), utilizând enzima transglutaminaza pentru reticulare. Eficiența încapsulării a fost de 54,14%, pentru proba P1, de 44,79%, pentru proba P2 și de 64,69%, pentru proba P3, cu o productivitate a microîncapsulării de 64,24%, 67,97% și de 70,22%.

Comparativ cu utilizarea proteinei singulare, în cazul utilizării izolatului proteic din zer, deci a unui complex proteic și a unor adjuvanți în microîncapsulare, respectiv guma acacia, eficiența de microîncapsulare a fost semnificativ îmbunătățită, fiind de circa 71%.

Rezultatele au relevat faptul că reacțiile de reticulare au îmbunătățit eficiența încapsulării antocianilor, care a fost de aproximativ 65%, comparativ cu circa 54%, în cazul probei P1 și 45%, în cazul probei P2.

Analiza FT-IR a demonstrat o creștere a componentei β -sheet în probele P2 și P3 comparativ cu proba P1, în timp ce microscopia confocală a indicat prezența unor nanoparticule distribuite într-o rețea omogenă în P1 și agregate de dimensiuni mai mari în P2 și P3, datorită agregării și reticulării moleculelor proteice.

Din punct de vedere structural și morfologic, pudra s-a prezentat ca un film subțire ce delimitează cavități largi (20-80 μm), cu aglutinarea microcapsulelor în coacervate mari.

Nu au fost observate diferențe semnificative în ceea ce privește activitatea antioxidantă a celor trei pudre, cu valori cuprinse între 473,23 \pm 0,58 $\mu\text{mol TE/g s.u.}$, pentru proba P2 și 476,10 \pm 0,11 $\mu\text{mol TE/g s.u.}$, pentru proba P3.

Eliberarea antocianilor a fost limitată în timpul digestiei gastrice, ceea ce sugerează că proteina poate fi folosită pentru a proteja antocianii în stomac, permițând o posibilă eliberare a compușilor biologic activi în intestin, cu un maxim de eliberare de 32%, în proba P1 și de 8%, în proba P2. Eliberarea a fost favorizată în intestin, cu un maxim de eliberare de circa 70%, în cazul P1.

Eliberarea antocianilor în sucul gastric simulat a fost limitată, de circa 39%, indicând faptul că proteinele din zer prezintă capacitatea de a proteja antocianii în stomac, permițând eliberarea componentelor bioactive în intestin.

Probele nu au prezentat activitate antimicrobiană pentru microorganismele indicator testate.

Rezultatele obținute sunt promițătoare din perspectiva dezvoltării compozitelor funcționale care prezintă activitate antioxidantă, culoare previzionată, conținut ridicat de compuși biologic activi, iar matricea utilizată are un nivel ridicat de protecție în digestia gastrică, cu o eliberare controlată în intestin.

În concluzie, rezultatele au permis optimizarea condițiilor de obținere a unor compozite cu funcționalitate demonstrată, pe bază de proteine din zer și extracte antocianice din pielită de vișine, cu morfologii bine structurate, cu activitate antioxidantă ridicată și cu stabilitate în condiții de digestibilitate *in vitro*, cu aplicabilitate în dezvoltarea unor tehnologii de obținere a alimentelor funcționale, nutraceuticelor sau cosmeceuticelor.

Capitolul 6. Studiul și valorificarea compușilor biologic activi din fructe de soc (*Sambucus nigra*)

6.1. Caracterizarea fitochimică și cinetica de degradare termică a compușilor bioactivi din extractele din fructele de soc (*Sambucus nigra* L.)

6.1.1. Aspecte generale

Beneficiile compușilor biologic activi din soc sunt studiate, dar puține studii abordează cinetica de degradare termică a acestor compuși în condițiile procesării. Prin urmare, în vederea descrierii funcționalității diferiților compuși biologic activi din fructele de soc la tratamentul termic, modificările în conținutul de antociani monomerici (CAM), polifenoli totali (CPT), flavonoide totale (CFT) și activitatea antioxidantă au fost investigate în intervalul de temperatură 100-160°C, pentru 0-120 minute. Adicional, proprietățile fluorescente ale extractelor au fost analizate după tratamentul termic menționat prin excitare la lungimile de undă 270 nm și 340 nm.

6.1.2. Materiale și metode

Reactivi

Fructele de soc românești (*Sambucus nigra* L.) au fost colectate din flora spontană a Complexului Muzeal de Științele ale Naturii „Răzvan Angheluță” din Galați, transportate în laborator în cutie frigorifică pe gheață, spălate cu apă distilată, uscate la temperatura camerei, apoi liofilizate. Fructele liofilizate au fost măcinate iar pudra rezultată a fost depozitată în recipiente de plastic ermetic închise, la temperatura de -20°C .

2,2-Difenil-1-picrilhidrazil-ul (DPPH), acidul 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilic (Trolox), acetatul de sodiu, clorura de potasiu, hidroxidul de sodiu, clorura de aluminiu, azotitul de sodiu, etanolul, metanolul, reactivul Folin-Ciocalteu și acidul formic (HPLC grade) au fost achiziționați de la compania Sigma Aldrich Steinheim, Germania. Standardele de cianidină și peonidină au fost achiziționate de la compania Extrasynthèse (Z.I Lyon Nord, Franța).

6.1.3. Rezultate și discuții

Profilul fitochimic al extractelor din fructele de soc (*Sambucus nigra* L.)

Conținutul de antociani monomerici din extractul din fructele de soc este exprimat ca mg de echivalenți cianidin-3-glucozid (C3G) per 100 g de substanță uscată (s.u.) și este de $36,85 \pm 1,52$ mg C3G/100 g s.u.

În **Figura 6.1.** este prezentat profilul cromatografic al extractului din fructe de soc, unde antocianii preponderenți evidențiați sunt pelargonidin-3-soforozid și delphinidin-3-glucozid.

S-au identificat 10 compuși antocianici: cianidin-3-sambubiozid-5-glucozid (peak 1 – 0,067 mg C3G/g s.u.), cianidin-3-soforozid (peak 2 – 0,038 mg C3G/g s.u.), cianidin-3-glucozil-rutinozid (peak 3 – 0,079 mg C3G/g s.u.), cianidin-3-sambubiozid (peak 4 – 0,242 mg C3G/g s.u.), pelargonidin-3-soforozid (peak 5 – 4,264 mg C3G/g s.u.), delphinidin-3-glucozid (peak 6 – 11,379 mg C3G/g s.u.), cianidin-3-glucozid (peak 7 – 0,107 mg C3G/g s.u.), cianidin-3-rutinozid (peak 8 – 0,061 mg C3G/g s.u.), peonidin-3-glucozid (peak 9 – 0,031 mg C3G/g s.u.) și peonidin-3-rutinozid (peak 10 – 0,003 mg C3G/g s.u.).

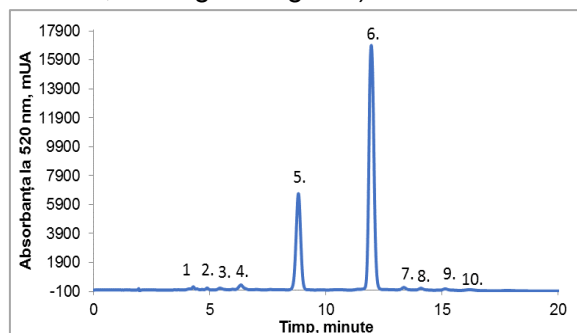


Figura 6.1. Profilul cromatografic al antocianilor din extractul din fructe de soc

Conținutul de flavonoide din extractul din fructe de soc a fost exprimat ca mg echivalenți catehină (EC) per 100 g substanță uscată (s.u.) și este de $270,36 \pm 2,28$ mg EC/100 g s.u.

În **Figura 6.2.** este prezentat profilul cromatografic al extractului din fructe de soc. Concentrația cea mai mare de flavonoide este dată de catechin hidrat (peak 2). Profilul flavonoidic a extractului din fructe de soc certifică prezența a patru compuși: epigallocatehină (peak 1 – 0,113 mg catechină/g s.u.), catechin hidrat (peak 2 – 3,227 mg catechină/g s.u.), epicatehină (peak 3 – 0,21 mg catechin/g s.u.) și quercetină (peak 4 – 0,171 mg catehină/g s.u.).

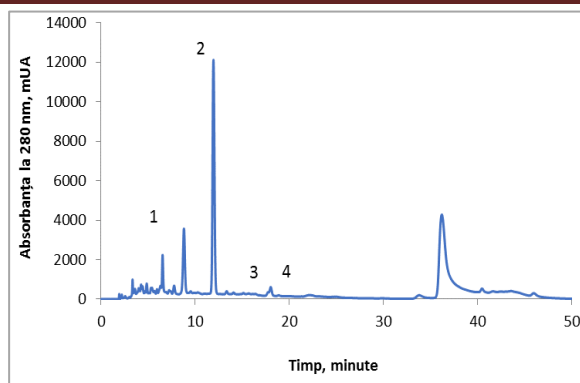


Figura 6.2. Profilul cromatografic al flavonoidelor din extractul din fructe de soc

Conținutul de polifenoli totali din extractul din fructe de soc a fost exprimat ca mg echivalenți acid galic (EAG) per 100 g substanță uscată (s.u.) și este de $526,26 \pm 9,35$ mg EC/100 g s.u.

Valoarea capacității de inhibiție a extractului din fructe de soc asupra radicalului DPPH a fost de $73,98 \pm 0,82\%$. Activitatea antioxidantă a extractului din fructe de soc a fost de $73,98 \pm 0,85\%$ și corespunde valorii de $483,96 \pm 0,21$ μ M Trolox (TE)/mg extract.

Influența tratamentului termic asupra intensității fluorescenței extractului din fructe de soc

Pentru evaluarea proprietăților spectrale ale extractului din fructe de soc, probele au fost excitate la trei lungimi de undă diferite λ_{max} 270 nm, 300 nm și 340 nm. Totodată, s-a monitorizat efectul tratamentului termic asupra intensității fluorescenței a extractului din fructe de soc, prin excitație la lungimea de undă de 270 nm și spectrul de emisie între 290 nm și 520 nm. În **Figura 6.4.** este prezentat spectrul de emisie al intensității fluorescenței în urma tratamentului termic al extractului din fructe de soc la temperaturi cuprinse între 25° - 150°C , cu un timp de menținere de 90 min. În general, creșterea temperaturii a condus la o descreștere a intensității fluorescenței și la apariția fenomenului de *red-shift* la λ_{max} . După cum se poate observa, în **Figura 6.4.**, maximul intensității fluorescenței s-a înregistrat pentru proba netratată termic, iar odată cu creșterea temperaturii intensitatea fluorescenței a scăzut cu aproximativ 32%. Tratamentul termic a condus la apariția unui *red-shift* de 12,5 nm la λ_{max} , ceea ce sugerează apariția unor evenimente moleculare importante.

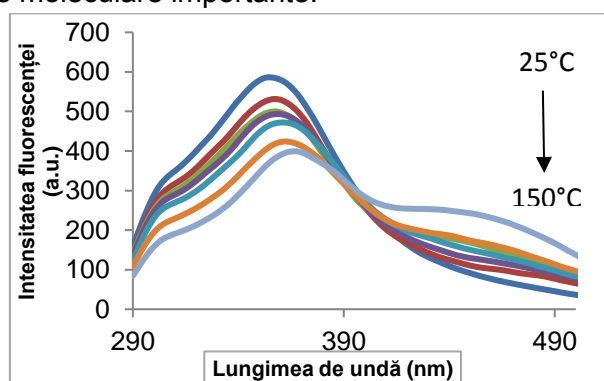


Figura 6.4. Spectrul fluorescenței obținut la excitație la lungimea de undă de 270 nm pentru extractul din fructe de soc tratat termic la diferite temperaturi și menținere la temperatură constantă, timp de 90 minute

Influența tratamentului termic asupra compușilor bioactivi din extractul din fructe de soc și asupra activității antioxidante

Evaluarea termostabilității compușilor bioactivi din extractul din fructe de soc s-a realizat prin studiul degradării termice la diferite combinații de temperatură-timp. Tratamentul termic la temperaturi de peste 100°C a condus la reducerea cantității de fitochimicale din extractul din

fructe de soc, dar și la o scădere a activității antioxidante (**Figura 6.5.**). Cantitatea de polifenoli totali și flavonoide totale nu a fost drastic afectată de tratamentul termic.

Cantitatea inițială de antociani, la temperatura de 25°C, a fost de 38,846 mg C3G/100 g s.u.

Tratamentului termic a condus la o scădere a cantității de antociani monomerici. Procentual, se observă o reducere a conținutului de antociani monomerici cu 59,96% și 99,18% pentru 100°C și respectiv 140°C, după o menținere la temperatură timp de 120 minute (**Figura 6.5. a.**). Tratamentul termic prelungit a condus la scăderea considerabilă a pigmentilor antocianidini, astfel că după 90 minute, la temperatura de 150°C, concentrația antocianilor din extractul din fructe de soc a fost de 0,267 mg/100 g s.u., iar după 120 minute de tratament termic la temperatura de 150°C, s-a observat distrugerea în totalitate a antocianilor.

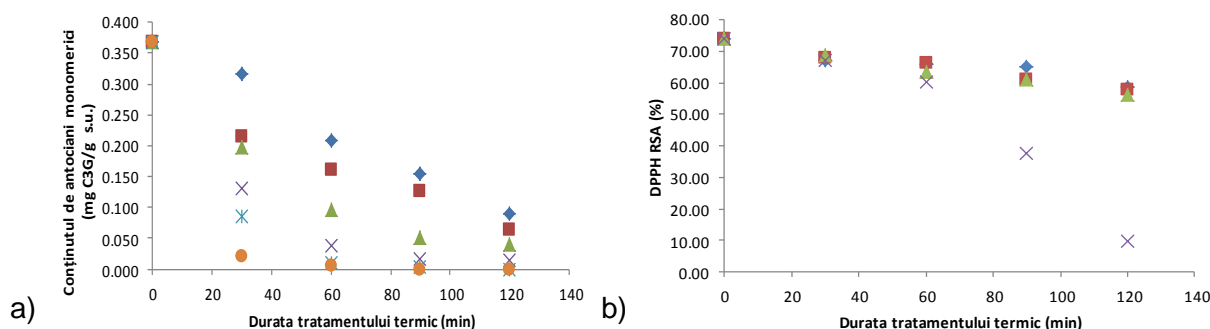


Figura 6.5. Degradarea termică a antocianilor monomerici CAM (a) și DPPH RSA (b) din extractul din fructe de soc tratat la diferite temperaturi (◆100°C, ■110°C, ▲120°C, ×130°C, *140°C și ●150°C)

În urma tratamentului termic, capacitatea antioxidantă, a scăzut, conform datelor prezentate în **Figura 6.5. b.** În intervalul de temperatură 100 – 150°C, s-a înregistrat o scădere a capacității antioxidante cuprinsă între 5-19%, pentru un timp de menținere de 60 minute.

Odată cu creșterea timpului de menținere la tratament termic, se observă o descreștere graduală a capacității antioxidante, astfel la temperatura de 110°C, după 120 minute, s-a înregistrat o scădere de 44%, iar la temperatura de 150°C se observă o degradare de aproximativ 87%. Descreșterea capacității antioxidante a extractului din fructe de soc la tratament termic este dată de degradarea termică a antocianilor.

În timpul tratamentului termic, se observă o creștere a conținutului de flavonoide, astfel că după o menținere timp de 120 minute, la temperatura de 150°C, concentrația de flavonoide a fost de 410,98±3,94 mg EC/100 g s.u. (**Tabelul 6.1.**).

Creșterea conținutului de flavonoide se poate datora formării compușilor monomerici rezultați din hidroliza legăturilor dintre C-glicozide, deoarece în majoritatea fructelor și legumelor flavonoidele există sub formă de C-glicozid dimer sau oligomer.

În paralel, concentrația de quercetin-4'-O-monoglucozid a crescut în primele minute de reacție. Formarea quercetinei s-a observat abia după 8 minute de la începerea reacției, iar valoarea rezultată a fost foarte scăzută.

Tabelul 6.1. Conținutul de polifenoli totali și flavonoide totale din extractul din fructe de soc, în diferite condiții de temperatură-timp

| Temperatura °C | Durata tratamentului termic (min) | CPT (mg EAG/100 g s.u.) | CFT (mg EC/100 g s.u.) |
|----------------|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 100 | 0 | 526,3±9,35 | 270,40±2,28 |
| | 30 | 535,07±10,03 | 406,13±10,15 |
| | 60 | 568,13±14,15 | 355,22±8,66 |

Compozite funcționale pe bază de proteine din zer și extracte vegetale din fructe roșii

| | | | |
|-----|-----|--------------|--------------|
| | 90 | 465,65±8,90 | 312,38±4,98 |
| | 120 | 423,79±12,19 | 402,90±11,51 |
| 110 | 0 | 526,3±9,35 | 270,40±2,28 |
| | 30 | 533,97±2,41 | 330,16±4,12 |
| | 60 | 542,79±8,16 | 382,69±5,16 |
| | 90 | 462,25±4,01 | 297,83±6,47 |
| | 120 | 485,50±5,21 | 346,33±4,63 |
| 120 | 0 | 526,3±9,35 | 270,40±2,28 |
| | 30 | 466,75±3,51 | 288,14±4,22 |
| | 60 | 481,08±2,43 | 410,17±3,37 |
| | 90 | 385,21±3,84 | 313,19±4,87 |
| | 120 | 455,73±4,85 | 399,67±5,69 |
| 130 | 0 | 526,3±9,35 | 270,40±2,28 |
| | 30 | 437,01±4,34 | 254,19±2,14 |
| | 60 | 375,29±2,84 | 232,37±3,44 |
| | 90 | 384,11±2,04 | 279,25±2,09 |
| | 120 | 347,74±2,85 | 343,09±2,28 |
| 140 | 0 | 526,3±9,35 | 270,40±2,28 |
| | 30 | 460,14±3,41 | 256,62±3,68 |
| | 60 | 390,72±2,28 | 333,39±2,66 |
| | 90 | 291,61±3,87 | 337,44±4,07 |
| | 120 | 274,32±4,41 | 281,67±3,01 |
| 150 | 0 | 526,3±9,35 | 270,40±2,28 |
| | 30 | 492,10±3,67 | 339,86±4,12 |
| | 60 | 413,86±3,18 | 415,02±3,51 |
| | 90 | 342,23±2,97 | 478,87±4,60 |
| | 120 | 266,19±2,55 | 410,98±3,94 |

După cum se poate observa în **Tabelul 6.1.**, după un tratament termic timp de 60 minute la temperaturile de 100°C și 110°C, conținutul total de polifenoli (CPT) a crescut de la valoarea de 526,3±9,35 mg EAG/100 g s.u. la 568,13±14,15 și respectiv 542,79±8,16 mg EAG/100 g s.u. Pe parcursul tratamentului termic, conținutul de compuși polifenolici a scăzut, cantitatea de acid galic a scăzut la jumătate, după 120 minute de tratament termic, la temperatura de 150°C. Creșterea concentrației de polifenoli în extractul din fructe de soc la temperaturile de 100°C și 110°C este dată, fie de ruperea legăturilor esterificate sau glicozilate, fie de formarea compușilor reacțiilor Maillard.

Se observă că în cazul extractului din fructe de soc, cantitatea de polifenoli a crescut în primele 60 de minute de tratament termic la temperatură constantă, urmată de o ușoară descreștere a concentrației.

Cinetica de degradare termică a compușilor bioactivi din extractul din fructe de soc

În **Tabelul 6.2.** sunt prezentate constantele vitezelor de degradare (k) și energia de activare (E_a) ale antocianilor monomerici, a intensității fluorescenței și a activității antioxidante, iar în **Figura 6.6.** este ilustrată degradarea termică a intensității fluorescenței (a), a antocianilor monomerici (b) și a DPPH RSA (c) din extractul din fructe de soc.

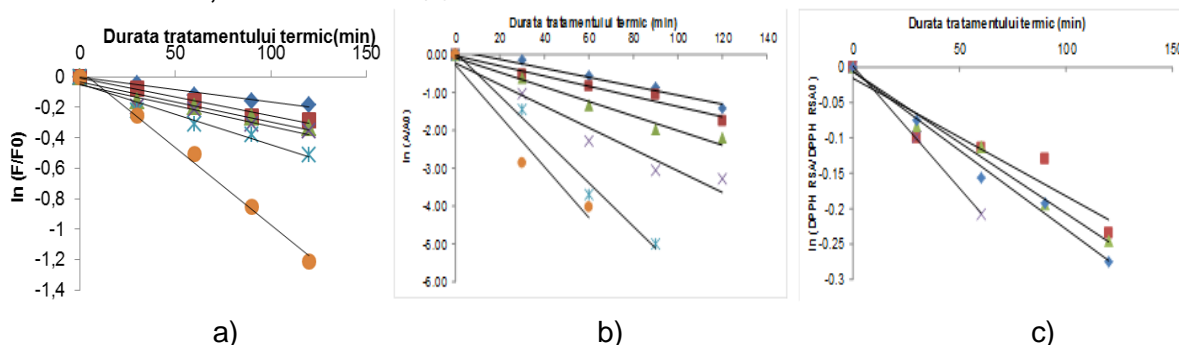


Figura 6.6. Degradarea izotermă a intensității fluorescenței (a), a antocianilor monomerici (b) și a DPPH RSA (c) în extractul din fructe de soc, tratat la diferite temperaturi (◆100°C, ■110°C, ▲120°C, ×130°C, *140°C și ●150°C)

Relațiile liniare descrise în **Figura 6.6.** indică faptul că degradarea termică a intensității fluorescenței, a antocianilor monomerici și a DPPH RSA a extractului din fructe de soc a urmat un model cinetic de degradare de ordinul I. Au fost calculate constantele vitezelor de reacție de ordinul I (k) și timpul de înjumătățire ($t_{1/2}$), în timp ce modelul Arrhenius a fost aplicat pentru a descrie dependența de temperatură a constantelor vitezei de degradare. În **Tabelul 6.2.** sunt prezentați parametrii cinetici. După cum se poate observa, în cazul degradării termice a antocianilor monomerici, s-a înregistrat o creștere semnificativă a valorii lui k , de la $1,19 \pm 0,01 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$ la $6,70 \pm 0,06 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$ în momentul creșterii temperaturii de la valoarea de 100°C la 150°C, în timp ce, în cazul degradării termice a intensității fluorescenței, valorile lui k au înregistrat valori mici, de la $0,16 \pm 0,01 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$, la temperatura de 100°C, la $1,01 \pm 0,09 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$, la temperatura de 150°C.

Conform valorilor constantelor de viteză k putem afirma că antocianii sunt compușii cei mai termolabili.

În cazul antocianilor monomerici, valoarea timpului de înjumătățire s-a situat între $58,2 \pm 2,52$ minute, pentru tratamentul la temperatura de 100°C și $10,20 \pm 1,98$ minute, pentru tratamentul la temperatura de 150°C (**Tabelul 6.2.**).

Conform datelor prezentate în **Tabelul 6.2.** energia de activare pentru degradarea termică a antocianilor monomerici este $49,97 \pm 5,61 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Valoarea ridicată a energiei de activare indică o dependență de temperatură a procesului de degradare a antocianilor monomerici.

Compozite funcționale pe bază de proteine din zer și extracte vegetale din fructe roșii

Tabelul 6.2. Parametrii cinetici (viteza de degradare – k și energia de degradare – E_a) de variație a intensității fluorescenței (IF), a antocianilor monomerici (CAM) și a DPPH RSA în urma tratamentului termic în extractul din fructe de soc

| Parametru | Temperatura °C | $k \cdot 10^2$ (min^{-1}) | R^2 | $t_{1/2}$ (h) | E_a (kJ/mol) | R^2 |
|-----------|----------------|--------------------------------------|-------|---------------|----------------|-------|
| IF | 100 | 0,16±0,02 | 0,97 | 7,22±0,89 | 39,62±9,60 | 0,80 |
| | 110 | 0,25±0,01 | 0,98 | 4,62±0,12 | | |
| | 120 | 0,26±0,02 | 0,95 | 4,44±0,45 | | |
| | 130 | 0,40±0,09 | 0,90 | 4,12±0,65 | | |
| | 140 | 0,43±0,12 | 0,95 | 2,88±0,78 | | |
| | 150 | 1,01±0,11 | 0,99 | 1,14±0,98 | | |
| CAM | 100 | 1,19±0,15 | 0,98 | 0,97±0,043 | 49,97±5,61 | 0,95 |
| | 110 | 1,34±0,20 | 0,96 | 0,86±0,023 | | |
| | 120 | 1,93±0,23 | 0,96 | 0,59±0,032 | | |
| | 130 | 2,86±0,45 | 0,96 | 0,40±0,042 | | |
| | 140 | 5,73±0,65 | 0,97 | 0,20±0,017 | | |
| | 150 | 6,70±0,74 | 0,95 | 0,17±0,08 | | |
| DPPH RSA | 120 | 0,17±0,06 | 0,96 | 6,79±0,49 | 31,04±9,92 | 0,87 |
| | 130 | 0,20±0,07 | 0,98 | 5,77±0,87 | | |
| | 140 | 0,22±0,09 | 0,95 | 5,25±0,64 | | |
| | 150 | 0,35±0,08 | 0,97 | 3,30±0,12 | | |

^a Deviația standard

În cazul activității antioxidante, valorile constantelor vitezei de degradare au fost mai mici comparativ cu cele ale antocianilor, dar mai mari decât ale intensității fluorescenței. Valorile lui k au fost de $0,45 \pm 0,02 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$, pentru temperatura de 110°C , până la $0,35 \pm 0,02 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$ pentru temperatura de 150°C .

Valorile timpului de înjumătățire $t_{1/2}$ au variat de la $7,22 \pm 0,98 \text{ h}$, în cazul modificărilor în intensitatea fluorescenței induse la tratament termic la temperatura de 100°C , până la $3,30 \pm 0,54 \text{ h}$ în cazul DPPH RSA la temperatura de 150°C (**Tabelul 6.2.**).

Dependența de temperatură ale constantelor de viteză a reacțiilor a fost exprimată cu ajutorul ecuației lui Arrhenius, prin urmare valorile energiilor de activare (E_a) sunt $49,97 \pm 5,61 \text{ kJ/mol}$ în cazul antocianilor, $39,62 \pm 9,60 \text{ kJ/mol}$, pentru intensitatea fluorescenței și $31,04 \pm 9,92 \text{ kJ/mol}$, pentru DPPH RSA (**Tabelul 6.2.**).

Conform parametrilor cinetici, degradarea antocianilor monomerici din extractul din fructe de soc este susceptibilă cu creșterea temperaturii tratamentului termic și prezintă impact asupra activității antioxidante.

6.1.4. Concluzii

Scopul studiului a fost acela de a realiza un screening complex al compușilor biologic activi din fructele de soc, cum ar fi identificarea și cuantificarea antocianilor monomerici totali și individuali, polifenoli, flavonoide și evaluarea impactului procesării termice asupra funcționalității acestor compuși în ceea ce privește activitatea antioxidantă, pe baza descrierii mecanismelor de degradare termică prin modelare cinetică.

Compozite funcționale pe bază de proteine din zer și extracte vegetale din fructe roșii

Analiza cromatografică a permis identificarea a 10 compuși antocianici, între care majoritari au fost: pelargonidin-3-soforozid și delphinidin-3-glucozid. Extractul din fructele de soc a fost caracterizat printr-un conținut de antociani monomerici de $36,85 \pm 1,52$ mg C3G/100 g s.u.

Cromatografia lichidă a condus la identificarea a patru compuși flavonoidici, catehin hidrat fiind compusul flavonoidic majoritar, în timp ce profilul flavonoidic global a evidențiat un conținut de $270,36 \pm 2,28$ mg EC/100 g s.u. și un conținut de polifenoli totali de $526,26 \pm 9,35$ mg EAG/100 g s.u.

Spectroscopia de fluorescență a fost utilizată pentru evaluarea proprietăților spectrale ale extractului din fructe de soc la diferite lungimi de undă la excitare, când s-a obținut o intensitate maximă prin excitarea la lungimea de undă de 270 nm și emisie maximă la lungimea de undă de 354 nm, caracteristice formelor hemiacetal ale antocianilor. În cazul excitărilor la lungimi de undă mai mari, spectrul de emisie prezintă două maxime de absorbție care sunt asociate formelor de izomeri calconici și formelor de calcone ionizate ale antocianilor.

Tratamentul termic a condus la o descreștere a intensității fluorescenței și la apariția fenomenului de *red-shift* la λ_{max} de maxim 12,5 nm, ceea ce sugerează apariția unor evenimente moleculare importante.

Tratamentul termic a indus un comportament diferit pentru clasele de compuși biologic activi. Astfel, s-a înregistrat o scădere a conținutului de antociani monomerici cu aproximativ 60% și 99% pentru temperatura de 100°C și respectiv 140°C, după o menținere la temperatură timp de 120 minute în timp ce după 120 minute de tratament termic la temperatura de 150°C, s-a observat distrugerea în totalitate a antocianilor.

Scăderea concentrației de antociani a avut un impact negativ asupra activității antioxidante, astfel că la temperatura de 110°C, după 120 minute, s-a înregistrat o scădere de 44%, iar la temperatura de 150°C se observă o degradare de aproximativ 87%.

În intervalul de temperatură studiat, conținutul de flavonoide a crescut, până la temperatura de 150°C, după care concentrația de flavonoide a înregistrat o scădere, probabil din cauza hidrolizei care conduce la formarea de agliconi instabili, care prin oxidare formează compuși cu masă moleculară mare, de culoare maro.

Conținutul de polifenoli totali a crescut în intervalul de temperatură 100-110°C, după 60 de minute de tratament. Concentrația obținută a scăzut la jumătate, după 120 minute de tratament termic la temperatura de 150°C, fenomen explicat fie prin ruperea legăturilor esterificate sau glicozilate, fie prin formarea compușilor specifici reacțiilor Maillard.

Degradarea termică a intensității fluorescenței, a antocianilor monomerici și a activității antioxidante, au fost descrise printr-un model cinetic de degradare de ordinul I, fapt care a permis estimarea constantelor vitezelor de reacție de ordinul I (k), și timpul de înjumătățire ($t_{1/2}$), în timp ce modelul Arrhenius a fost aplicat pentru a descrie dependența de temperatură a constantelor vitezei de degradare. Valorile k ce descriu degradarea antocianilor monomerici și a intensității fluorescenței au crescut de circa 6 ori, prin creșterea temperaturii de la 100°C la 150°C.

Valorile energiilor de activare au arătat o dependență de temperatură mai mare în cazul degradării termice a antocianilor, comparativ cu intensitatea fluorescenței și activitatea antioxidantă, fapt care denotă că fluorescența și activitatea antioxidantă sunt determinate de un complex de compuși cu termostabilitate diferită.

Extractul din fructe de soc este solubil în apă facilitând utilizarea acestuia în industria alimentară și farmaceutică, pentru producerea de bioingrediente și nutraceutice, iar capacitatea antioxidantă ridicată chiar și la temperaturi mari (120°C -130°C) permite utilizarea acestuia ca și fortifiant în produsele alimentare.

Informațiile privind factorii ce determină o degradare a compușilor fenolici din extractele vegetale, sunt necesare pentru a optimiza condițiile proceselor tehnologice industriale și pentru a minimiza pierderea sau degradarea componentelor bioactive.

6.2. Evaluarea mecanismelor de legare dintre compușii bioactivi din fructele de soc și proteinele din zer

6.2.1. Aspecte generale

Prezentul studiu a vizat caracterizarea proceselor de legare ale extractului din fructe de soc (ES) și izolatul proteic din zer (IPZ), în perspectiva dezvoltării de noi produse/compozite funcționale sau nutraceutice. Pentru a putea determina mecanismul de legare al antocianilor și flavonoidelor din extractul de fructe de soc s-au utilizat experimente de quenching ale IPZ cu ES. Particularitățile de legare ale principalilor compuși bioactivi din ES cu IPZ au fost identificate cu ajutorul modelării moleculare. Rezultatele obținute în acest studiu pot fi utilizate în perspectiva dezvoltării de compozite funcționale cu rol de nutraceutice sau pentru formularea unor alimente.

6.2.2. Materiale și metode

Reactivi

Izolatul proteic din zer (conținut în proteine de 90%) a fost achiziționat de la Fonterra (New Zealand). 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilul (DPPH), acidul 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilic (Trolox), reactivul Folin-Ciocalteu, carbonatul de sodiu, hidroxidul de sodiu, acetatul de sodiu, nitritul de sodiu, clorura de potasiu, clorura de aluminiu, acidul galic, persulfatul de potasiu, acidul formic, etanolul și metanolul au fost obținuți de la Sigma Aldrich Steinheim, Germania. Cianidina și pelargonidina sub formă de standarde au fost obținute de la Extrasynthèse (Z.I Lyon Nord, Franța).

6.2.3. Rezultate și discuții

Caracterizarea fitochimică a extractului etanolic din fructe de soc

Extractul a fost caracterizat privind conținutul de fitochimicale, iar rezultatele au fost centralizate în **Tabelul 6.3**.

Tabelul 6.3. Parametrii fizico-chimici ai extractului din fructe de soc utilizat la studii de legare cu IPZ

| Substanța uscată, % | pH | Conținutul de polifenoli totali (mg EAG/ g su) | Conținutul de antociani monomerici (mg C3G/g su) | Conținutul de flavonoide totale (mg EC/g su) | Activitatea antioxidantă (μ M Trolox/g su) |
|---------------------|------|---|---|---|--|
| 87,20 \pm 0,20* | 4,08 | 10,82 \pm 0,06 | 1652,92 \pm 7,41 | 8,64 \pm 0,016 | 3841,98 \pm 2,84 |

*valorile deviației standard

Extractul de soc a prezentat o activitate antioxidantă de 96,99 \pm 2,01% echivalent cu 3841,97 \pm 28,40 μ M Trolox/g s.u.

Analiza proprietăților de legare ale extractului din fructe de soc cu proteinele din zer

În forma sa nativă, IPZ prezintă un λ_{max} la lungimea de undă de 332 nm, în timp ce tratamentul termic la temperaturile de 90°C și 100°C a condus la apariția unui *red-shift* de 2-3 nm. Adăugarea unei concentrații de 0,301 μ M de ES (exprimat ca μ M C3G/L) a condus la apariția unor fenomene semnificative de *red-shift* de 26,5 nm, la temperatura de 25°C, 29 nm, la 80°C și 27 nm, la 100°C, ceea ce sugerează apariția unor evenimente moleculare importante între IPZ și compușii bioactivi din ES. Fenomenele semnificative de *red-shift* indică modificări confirmaționale semnificative, cu expunerea regiunilor hidrofobe ale proteinelor.

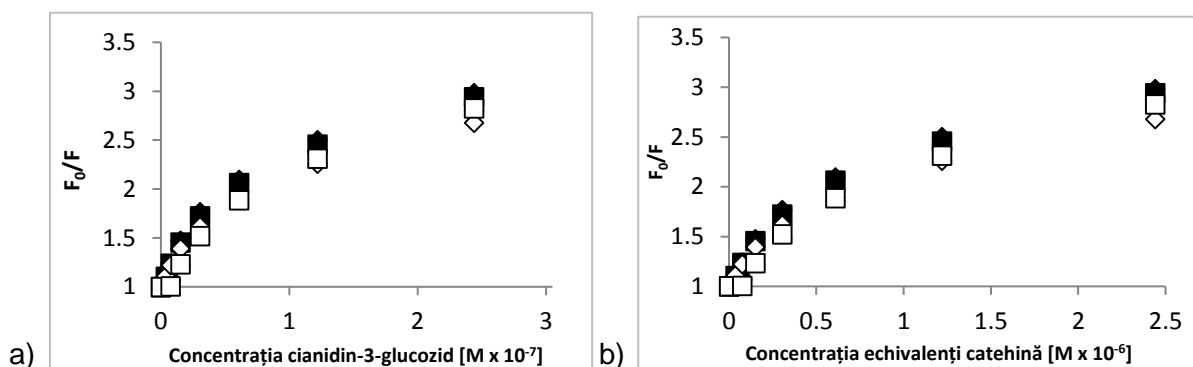


Figura 6.8. Reprezentarea Stern-Volmer pentru experimentele de quenching ale IPZ cu antocianii (a) și flavonoidele (b) din ES la diferite temperaturi (♦ 25°C, ■ 70°C, ▲ 80°C, ◇ 90°C, □ 100°C)

Pentru determinarea constantei K_a , s-a utilizat ecuația Stern-Volmer modificată. Conform **Figurii 6.8., a și b**, se poate observa că ambele corelații nu sunt liniare, indicând faptul că nu toate resturile de Trp sunt accesibile compușilor bioactivi din ES. Constantele de legare K_a împreună cu fracțiunea accesibilă (f_a) sunt prezentate în **Tabelul 6.4**. Valorile constantelor K_a ale legării flavonoidelor din ES și IPZ au valori mai mari comparativ cu cele ale antocianilor (**Tabelul 6.4.**), indicând faptul că flavonoidele se leagă preferențial de IPZ. Această ipoteză este susținută și de valoarea lui f_a , care are valori mai mari pentru flavonoide decât pentru antociani, cu excepția temperaturii de 70°C, caz în care, aproape toate regiunile hidrofobe ale IPZ sunt accesibile antocianilor din ES. Cu toate acestea se observă faptul că tratamentul termic conduce la creșterea valorii lui f_a , pentru flavonoide și descreșterea valorilor lui f_a pentru antociani.

Tabelul 6.4. Parametrii de legare ale izolatului proteic din zer tratat termic la diferite temperaturi cu antocianii (a) și flavonoidele (b) din extractul din fructe de soc

| T(°C) | $K_a(10^{-7}L/mol)$ | f_a | $K_q(10^{-15}l/mol/s)$ | $K_b(10^{-7}L/mol)$ | n |
|-------|------------------------|-----------|------------------------|---------------------|------------|
| 25 | 4,37±0,16 ^a | 0,66±0,01 | 4,37±0,16 | 0,32±0,04 | 0,25±0,001 |
| 70 | 4,07±0,09 | 0,96±0,09 | 4,07±0,09 | 0,32±0,05 | 0,20±0,01 |
| 80 | 3,86±0,24 | 0,77±0,09 | 3,86±0,24 | 0,35±0,01 | 0,18±0,001 |
| 90 | 3,49±0,07 | 0,78±0,19 | 3,49±0,07 | 0,42±0,01 | 0,15±0,003 |
| 100 | 3,06±0,27 | 0,79±0,02 | 3,06±0,27 | 0,42±0,01 | 0,15±0,002 |

^a deviație standard

| T(°C) | $K_a(10^{-6}L/mol)$ | f_a | $K_q(10^{-14}l/mol/s)$ | $K_b(10^{-6}L/mol)$ | n |
|-------|------------------------|-----------|------------------------|---------------------|------------|
| 25 | 5,14±0,17 ^a | 0,69±0,08 | 5,14±0,17 | 0,33±0,01 | 0,24±0,001 |
| 70 | 4,40±0,68 | 0,71±0,01 | 4,40±0,68 | 0,36±0,05 | 0,25±0,10 |
| 80 | 4,14±0,80 | 0,82±0,09 | 4,14±0,80 | 0,40±0,05 | 0,10±0,09 |
| 90 | 3,70±0,48 | 0,84±0,01 | 3,70±0,48 | 0,43±0,01 | 0,11±0,06 |
| 100 | 2,44±0,72 | 0,86±0,03 | 2,44±0,72 | 0,43±0,01 | 0,13±0,01 |

^a deviație standard

În timpul tratamentului termic s-a înregistrat o scădere a valorilor lui K_a odată cu creșterea temperaturii, sugerând un proces static de quenching. Valoarea maximă a lui f_a pentru antociani a fost estimată în jurul temperaturii de 70°C, iar pentru flavonoide la 100°C.

În **Tabelul 6.4.** se observă o descreștere a valorilor lui K_q odată cu creșterea temperaturii. Cu toate acestea, se observă ca valorile calculate ale lui K_q sunt mai mici decât constanta quenchingului de coliziune maximă ($2,0 \times 10^{-10}$ mol/L/sec) a biopolimerilor (Rub și colab., 2014), ceea ce sugerează prezența unui proces de quenching dinamic. Prin urmare, în cazul interacțiunii dintre IPZ și compușii bioactivi din ES avem de a face cu o combinație de mecanisme de quenching static și dinamic.

Conform ecuației (6.2), valorile intensității fluorescenței au fost utilizate pentru a estima valorile constatelor de legare (K_b) și numărul de situsuri de legare (n) dintre IPZ și antociani, respectiv flavonoide. În cazul ambilor compuși, valorile lui K_b au crescut odată cu creșterea temperaturii, sugerând existența unor modificări în jurul situsului de legare ce au permis schimbarea capacității de legare dintre IPZ și compuși. Din **Tabelul 6.4.** se observă faptul că valorile lui K_b pentru flavonoide sunt de zece ori mai mari decât cele ale antocianilor, iar numărul situsurilor de legare n descrește semnificativ odată cu creșterea temperaturii, sugerând de asemenea o descreștere a afinității de legare.

Pentru evaluarea forțelor ce acționează asupra interacțiunilor dintre IPZ și flavonoide/antociani din ES, s-a realizat un studiu termodinamic, ce a permis estimarea schimbărilor în entalpie (ΔH), entropie (ΔS) și energia Gibbs (ΔG) utilizând ecuația lui van't Hoff. Rezultatele sunt prezentate în **Tabelul 6.5.** Valorile estimate ale lui ΔH și ΔS pentru mecanismele de legare au fost de $-382,83 \pm 16,62$ J/mol, și $0,11 \pm 0,02$ J/mol·K, pentru mecanismul de legare al antocianilor și respectiv $-415,65 \pm 10,11$ J/mol și $0,27 \pm 0,01$ J/mol·K, pentru mecanismul de legare al flavonoidelor. Rezultatele indică faptul că forțele principale care stabilizează complexul IPZ-ES sunt de natură electrostatică. Valorile negative ale lui ΔH indică caracterul exoterm al interacțiunii, în timp ce valorile pozitive ale lui ΔG pentru toate temperaturile studiate indică faptul că procesul de legare dintre IPZ și ES este nesponant.

Tabelul 6.5. Parametri termodinamici ai asocierii dintre izolatul proteic din zer tratat termic și antociani (a), respectiv flavonoide (b) din extractul din soc

| a) | T(K) | ΔH (J/mol) | ΔS (J/mol·K) | ΔG (J/mol) | R^2 |
|----|------|--------------------|----------------------|--------------------|-------|
| | 298 | | | -710,25±15,98 | |
| | 343 | | | -817,50±13,20 | |
| | 353 | -1197,4±11,21 | 2,38±0,14 | -841,34±12,17 | 0,89 |
| | 363 | | | -856,17±10,85 | |
| | 373 | | | -889,00±10,43 | |
| b) | T(K) | ΔH (J/mol) | ΔS (J/mol·K) | ΔG (J/mol) | R^2 |
| | 298 | | | -372,02±10,34 | |
| | 343 | | | -428,20±9,12 | |
| | 353 | -765,20±9,84 | 1,24±0,17 | -440,68±13,27 | 0,90 |
| | 363 | | | -453,16±11,59 | |
| | 373 | | | -465,65±16,58 | |

Spectrele sincron au fost efectuate pentru a investiga natura micromediului din vecinătatea grupărilor fluorofore din complexul format dintre IPZ și ES, în timpul tratamentului termic. Caracteristicile micromediului resturilor de Trp au fost obținute la $\Delta\lambda$ de 60 nm, după adăugarea unei concentrații maxime de ES (0,301 μM C3G/L). În cazul IPZ netratat termic, adăugarea de ES a condus la apariția unui *red-shift* de 11 nm în cazul valorii lui λ_{max} , de la 272 nm la 283 nm.

Creșterea temperaturii a permis apariția unor evenimente moleculare locale importante. În **Figura 6.9.** este prezentat spectrul sincron al complexului tratat termic la diferite temperaturi la $\Delta\lambda$ de 60 nm. Tratamentul termic până la temperatura de 80°C a indus o creștere a intensității fluorescenței, urmată apoi de o descreștere pentru temperaturi mai ridicate, fără modificări ale valorilor λ_{max} .

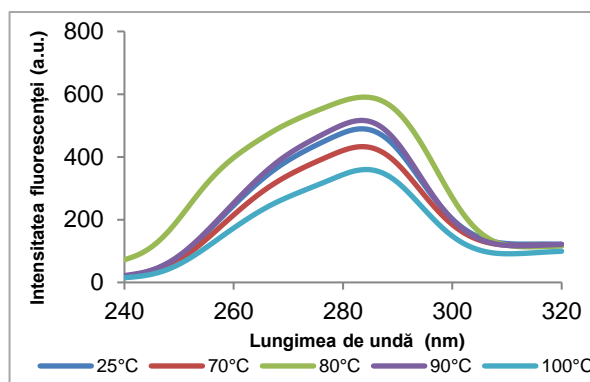


Figura 6.9. Spectre sincron ale complexului izolat proteic din zer – extract din fructe de soc, la $\Delta\lambda=60$ nm și la diferite temperaturi

Investigații la nivel molecular ale mecanismului de legare dintre β -LG și moleculele de antociani și flavonoide din extractul din soc

Pentru elucidarea mecanismului de legare dintre antocianul și flavonoidul majoritar din ES și IPZ, s-a utilizat un model 3D a principalei proteine din zer, β -LG. Modelul 3D a avut rolul de receptor pentru interacțiunea cu moleculele de D3G și CAT.

Analiza complexelor proteină-ligand a permis explicarea fenomenelor experimentale. După rularea testelor de andocare moleculară nu s-a observat niciun rest de Trp îngropat în interiorul proteinei, prin urmare aceste date sprijină testele de spectroscopie de fluorescență care demonstrează accesibilitatea limitată a compușilor bioactivi din ES la resturile de Trp din izolatul proteic din zer. Cu toate acestea, ligandul D3G este localizat în vecinătatea restului de Trp⁶¹ din structura β -LG, ceea ce explică fenomenul de *red-shift*, ce a apărut la λ_{max} , în momentul adăugării ES în IPZ netratat termic.

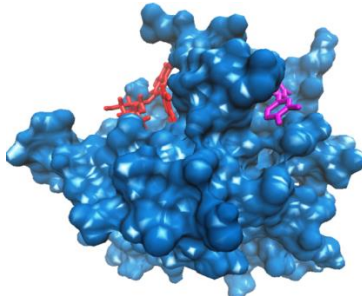


Figura 6.10. Superpoziția modelului obținut prin andocarea moleculei de β -LG cu delphinidin-3-glucozid (roșu) și catehină (violet). Imaginea a fost realizată cu ajutorul soft-ware-ului VMD, proteina fiind reprezentată în albastru în stilul *Surf*, iar liganzii sunt reprezentați în stilul *Licorice*

Din totalul suprafeței proteinei de 8048,8 Å², aproximativ 2,77% rămâne îngropată în momentul formării complexului cu ligandul CAT și doar 0,83% la legarea de C3G. Indiferent de

ligandul luat în considerare pentru procedura de andocare moleculară, nu s-a observat nicio perturbare la nivelul conformației situsului de legare sau a caracteristicilor structurale ale β -LG, atunci când s-au analizat modelele pre și post interacțiunii dintre C3G și CAT. Cavitatarea unde se leagă molecula de D3G implică un număr considerabil de aminoacizi (Pro³⁸, Leu³⁹, Val⁴¹, Leu⁵⁸, Lys⁶⁰, Ala⁶⁷, Lys⁶⁹, Ile⁷¹, Asp⁸⁵, Ala⁸⁶, Leu⁸⁷, Asn⁹⁰, Met¹⁰⁷, Glu¹⁰⁸, Asn¹⁰⁹) și este mai mare comparativ cu cea a moleculei de CAT, care prezintă capacitatea de a penetra tunelul îngust format de resturile de aminoacizi Ile⁷⁸, Val⁸¹, Lys⁹¹, Leu⁹³, Glu¹⁰⁸, Ala¹¹¹, Gln¹¹⁵, Leu¹¹⁷ (**Figura 6.10.**). În stabilizarea complexului format de β -LG și CAT sunt implicate trei legături de hidrogen de la resturile Glu¹⁰⁸ și Gln¹¹⁵ și gruparea hidroxil al heterociclului dihidropiran, în timp ce doar o singură moleculă de hidrogen leagă rezidul Pro³⁸ de gruparea hidroxil al C6 din molecula de glucoză în cazul complexului β -LG-D3G.

Deși au fost observate interacțiuni mai mari în cazul complexului β -LG-CAT, energia de activare (-103,09 kJmol⁻¹) a fost mai mare comparativ cu cea a complexului β -LG-D3G (-139,29 kJmol⁻¹). Mai mult, se pare că din punct de vedere termodinamic, complexul β -LG-D3G este mult mai stabil (ΔG^{diss} de 9,20 kJmol⁻¹) și trebuie aplicate forțe motrice exterioare pentru a putea disocia complexul, pe când complexul β -LG-CAT pare a fi instabil (ΔG^{diss} de -26,78 kJmol⁻¹).

6.2.4. Concluzii

Două tehnici complementare, cum ar fi experimentele de quenching și modelarea moleculară au fost utilizate pentru descrierea în detaliu a mecanismelor de legare dintre compușii biologic activi și proteinele din zer, din perspectiva dezvoltării de noi compozite funcționale sau nutraceutice.

Spectroscopia de fluorescență a presupus utilizarea unor tehnici complementare, cum ar fi: fluorescența intrinsecă, diagrama de faze, fluorescența extrinsecă, spectrele sincron și experimentele de quenching cu acrilamidă și KI pentru a descrie modificările induse de tratamentul termic în structura moleculelor proteice din complexul format între principala proteină din zer și antocianii din extract.

Fenomenul de legare între proteinele din zer și compușii biologic activi din extractul din fructe de soc au fost evidențiate printr-un *red-shift* semnificativ de 26,5 nm, la temperatura de 25°C, 29 nm, la temperatura de 80°C și 27 nm, la temperatura de 100°C, ceea ce sugerează apariția unor evenimente moleculare importante între proteine și compușii bioactivi.

Corelația Stern-Volmer nu a fost liniară, indicând faptul că nu toate resturile de Trp sunt accesibile compușilor bioactivi, fiind aplicată o relație modificată, fapt care a permis estimarea constantei de afinitate K_a și a fracțiunii accesibile atât pentru antociani cât și pentru flavonoide.

Valorile constantelor K_a ale legării flavonoidelor au valori mai mari comparativ cu cele ale antocianilor, indicând astfel că flavonoidele se leagă preferențial de proteinele din zer, fapt susținut de valorile fracțiunilor proteice accesibile care au prezentat valori mai mari pentru flavonoide decât pentru antociani, cu excepția temperaturii de 70°C.

Tratamentul termic a condus la creșterea accesibilității pentru flavonoide și descreșterea accesibilității pentru antociani, cu o scădere a valorilor lui K_a și K_q odată cu creșterea temperaturii, sugerând prezența unui mecanism de quenching combinat, static și dinamic.

Valorile parametrilor termodinamici au indicat implicarea forțelor de natură electrostatică în formarea complexului dintre proteinele din zer și flavonoide, procesul de legare fiind nespontan.

Din analiza detaliată a evenimentelor moleculare, nu s-a observat nicio perturbare la nivelul conformației situsului de legare sau a caracteristicilor structurale ale β -LG, atunci când s-au analizat modelele pre și post interacțiunii dintre cianidin 3-glucozid și catehină. Cavitatarea unde se leagă molecula de delfinidin 3-glucozid implică un număr considerabil de aminoacizi (Pro³⁸, Leu³⁹, Val⁴¹, Leu⁵⁸, Lys⁶⁰, Ala⁶⁷, Lys⁶⁹, Ile⁷¹, Asp⁸⁵, Ala⁸⁶, Leu⁸⁷, Asn⁹⁰, Met¹⁰⁷, Glu¹⁰⁸,

Asn¹⁰⁹) și este mai mare comparativ cu cea a moleculei de catehină, care prezintă capacitatea de a penetra tunelul îngust format de resturile de aminoacizi Ile⁷⁸, Val⁸¹, Lys⁹¹, Leu⁹³, Glu¹⁰⁸, Ala¹¹¹, Gln¹¹⁵, Leu¹¹⁷.

În stabilizarea complexului format de β -lactoglobulină și catehină sunt implicate trei legături de hidrogen de la resturile Glu¹⁰⁸ și Gln¹¹⁵ și gruparea hidroxil al heterociclului dihidropiran, în timp ce doar o singură moleculă de hidrogen leagă rezidul Pro³⁸ de gruparea hidroxil al C₆ din molecula de glucoză în cazul complexului β -LG-D3G.

Datele obținute au caracter de cercetare fundamentală cu aplicabilitate practică în elucidarea mecanismelor de legare dintre compușii biologic activi și optimizarea condițiilor de microîncapsulare din perspectiva obținerii de compozite cu funcționalitate controlată.

6.3. Investigații privind microîncapsularea compușilor bioactivi din fructele de soc (*Sambucus nigra L.*) utilizând proteinele din zer ca matrice

6.3.1. Aspecte generale

În această etapă, compușii biologic activi din extractul din fructe de soc (ES) au fost microîncapsulați în matricea izolat proteic din zer – pectină (IPZ-PE) prin liofilizare. Pudrele au fost caracterizate privind conținutul de compuși bioactivi, activitatea antioxidantă și eficiența încapsulării. Rezultatele au valoare aplicativă pentru obținerea unor ingrediente funcționale inovatoare, cu efecte benefice asupra sănătății și calității vieții.

6.3.2. Materiale și metode

Reactivi

Izolatul proteic din zer (IPZ) (conținut în proteine de 90%) a fost achiziționat de la compania Fonterra (New Zealand). Pectina (PE), 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilul (DPPH), acidul 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilic (Trolox), reactivul Folin-Ciocalteu, carbonatul de sodiu, hidroxidul de sodiu, acetatul de sodiu, nitritul de sodiu, clorura de potasiu, clorura de aluminiu, acidul galic, persulfat de potasiu, acidul formic, etanolul și metanolul au fost achiziționați de la compania Sigma Aldrich Steinheim, Germania.

6.3.3. Rezultate și discuții

Conținutul de compuși bioactivi și activitatea antioxidantă a microcapsulelor

Analiza compușilor bioactivi din microcapsule a reliefat următoarele rezultate: activitatea antioxidantă de $3,695,67 \pm 0,67$ μ M Trolox/g s.u., cu o inhibiție asupra radicalului DPPH de $73,65 \pm 2,05\%$, conținutul de polifenoli totali de $5,59 \pm 0,02$ mg EAG/g s.u., conținutul de flavonoide totale de $1,19 \pm 0,02$ mg EC/g s.u. și conținutul de antocani monomerici de $307,82 \pm 1,57$ mg C3G/g s.u.

Eficiența încapsulării

Eficiența încapsulării este unul din cei mai importanți parametri de caracterizare a procesului de microîncapsulare. Eficiența încapsulării a fost de $97,13 \pm 1,47\%$.

Structura morfologică a microcapsulelor

Microscopia confocală a pudrelor obținute prin liofilizare a confirmat prezența compușilor bioactivi (antociani și flavonoide) din extractul din fructe de soc, aceștia fiind înglobați sau încapsulați în matricea formată din proteine din zer și pectină. Testele de autofluorescență au scos în evidență o rețea întinsă de tip "ochi de sită" cu mărimea cuprinsă între 40 – 150 μ m și diferite formațiuni sferice și poligonale de diferite dimensiuni și mărimi (**Figura 6.11. a**). Probele hidratate și colorate au prezentat o distribuție uniformă a compușilor bioactivi (evidențiați cu verde) în matrice (roșu), cu aranjament sub formă de ciorchine, mai mult sau mai puțin compacți (**Figura 6.11. b**). Prin urmare, putem afirma că izolatul proteic din zer poate fi considerat unul

din cele mai bune matrici pentru microîncapsularea prin liofilizare a compușilor bioactivi, putând fi utilizat în industria alimentară pentru dezvoltarea de alimente funcționale.

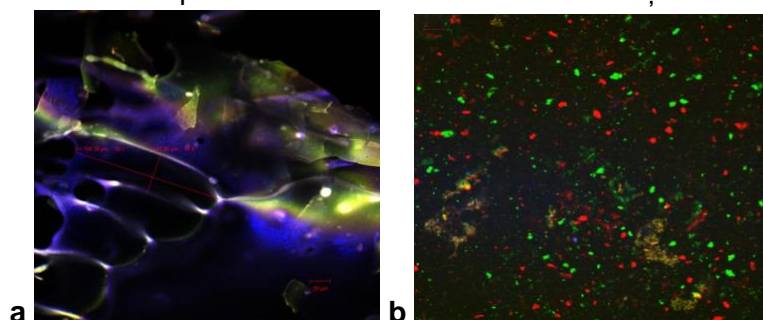


Figura 6.11. Imagini microscopice analizate prin CLSM LSM 710 pentru (a) pudra nativă și (b) complexul hidratat și colorat cu fluorocromi

Parametrii de culoare ai microcapsulelor

În **Tabelul 6.6.** sunt evidențiați parametrii de culoare ale pudrelor. Pudra a prezentat o valoare ridicată a parametrului a^* datorită conținutului mare de antociani monomerici (Jiménez-Aguilar și colab., 2011). Valoarea negativă a parametrului b^* sugerează că pudra microcapsulată prezintă o culoare albastru-intens. Valori mari ale lui a^* și mici ale parametrului H^o indică faptul că pudra prezintă nuanțe de culoare mov.

Tabelul 6.6. Parametrii de culoare ale microcapsulelor IPZ-ES

| Probă | L^* | a^* | b^* | Hue | Chroma |
|-------|------------|------------|------------|------------|----------|
| Pudră | 61,82±0,35 | 15,74±0,20 | -5,23±0,11 | -1,24±0,03 | 3,07±0,1 |

Cinetica de degradare termică

Analiza comportamentului la tratament termic a microcapsulelor, furnizează informații privind stabilitatea materialului încapsulant, precum și interacțiunile dintre extract și proteină în cazul unor procese tehnologice. Stabilitatea polifenolilor din pudra microîncapsulată la tratament termic a fost evaluată prin menținerea soluțiilor apoase la temperaturi de 80°C, 90°C și 100°C, timp de 0, 10, 20 și 30 minute, în prezența oxigenului.

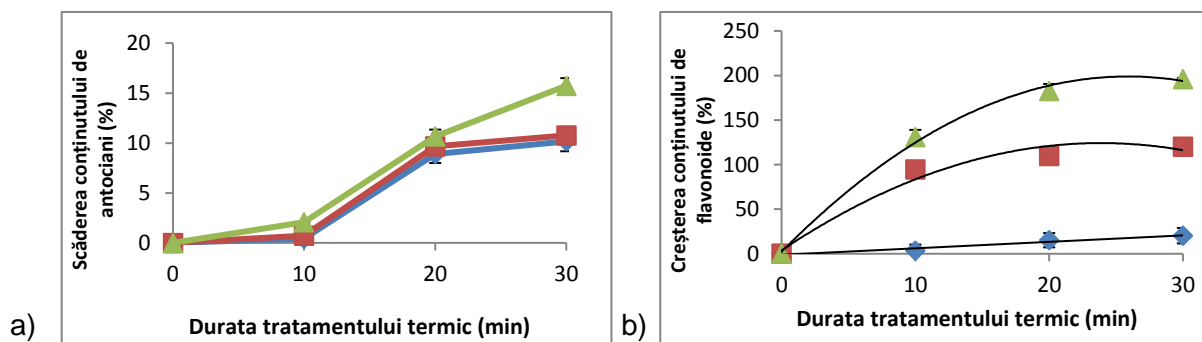


Figura 6.12. Efectul temperaturii asupra stabilității antocianilor (a) și a flavonoidelor (b) în pudra microîncapsulată (■ 80°C, ◆ 90°C și ▲ 100°C).

Figura 6.12. a și b prezintă comportamentul antocianilor (a) și al flavonoidelor (b) la diferite temperaturi. În **Figura 6.12. a** se observă că antocianii prezintă o stabilitate crescută la tratament termic. Pudra prezintă o stabilitate ridicată la temperatura de 80°C, cu un procent de conservare al antocianilor cuprins între 99,57±0,43%, după 10 minute de tratament termic și 89,83±1,24%, după 30 minute, conform datelor prezentate în **Figura 6.12. a**. Stabilitatea antocianilor a scăzut la temperaturi mai mari, cu procente de retenție de 89,23±1,45% și 84,26±1,02%, după un tratament termic de 30 minute, la temperatura de 90°C și respectiv, temperatura de 100°C. Degradarea antocianilor a urmat un model cinetic de ordinul I, cu valori

Compozite funcționale pe bază de proteine din zer și extracte vegetale din fructe roșii

ale vitezei k cuprinse între $0,41 \pm 0,01 \cdot 10^{-2}$ 1/minute, la temperatura de 80°C și $0,94 \pm 0,11 \cdot 10^{-2}$ 1/minute, la temperatura de 100°C .

Parametrii cinetici sunt prezentați în **Tabelul 6.7**.

Tabelul 6.7. Parametrii cinetici pentru degradarea termică a antocianilor în pudra microîncapsulată de IPZ-ES

| Compus | Temperatura $^{\circ}\text{C}$ | D (min) | $k \cdot 10^{-2}$ (1/min) | R^2 | z ($^{\circ}\text{C}$) | E_a (kJ/mol) |
|-----------|--------------------------------|--------------------|---------------------------|-------|----------------------------|------------------|
| Antociani | 80 | $555,55 \pm 10,21$ | $0,41 \pm 0,01$ | 0,87 | $55,86 \pm 3,46$ | $44,69 \pm 6,52$ |
| | 90 | $526,31 \pm 11,45$ | $0,43 \pm 0,02$ | 0,87 | | |
| | 100 | $240,90 \pm 17,78$ | $0,94 \pm 0,11$ | 0,95 | | |

În **Figura 6.12. b** este prezentat efectul tratamentului termic asupra conținutului de flavonoide. După cum se poate observa, conținutul în flavonoide crește odată cu creșterea temperaturii, cu o durată a tratamentului termic de până la 30 minute., în special la temperatura de 90°C și la temperatura de 100°C , ceea ce sugerează o degradare a materialului proteic microîncapsulant și eliberarea acestor compuși.

6.3.4. Concluzii parțiale

În cadrul acestui capitol a fost investigată posibilitatea de microîncapsulare a compușilor bioactivi din fructele de soc (*Sambucus nigra* L.), utilizând proteinele din zer și pectina ca matrici de încapsulare, din perspectiva dezvoltării de compozite cu rol potențial de ingrediente funcționale.

Tehnica abordată a permis obținerea unei pudre de culoare mov închis, cu o eficiență de microîncapsulare ridicată, de 97% și un conținut semnificativ de compuși biologic activi, cum ar fi: antociani monomerici totali de $307,82 \pm 1,57$ mg C3G/g s.u., flavonoide totale de $1,19 \pm 0,02$ mg EC/g s.u. și conținutul de polifenoli totali de $5,59 \pm 0,02$ mg EAG/g s.u., ceea ce a generat o activitate antioxidantă ridicată de 3,7 mM Trolox/g s.u.

Din punct vedere structural și morfologic, pudra a evidențiat prezența compușilor bioactivi (antociani și flavonoide) încapsulați în matricea formată din proteine din zer și pectină, cu o structură tip "ochi de sită", având dimensiuni cuprinse între 40–150 μm , cu forme sferice și poligonale.

În vederea evaluării efectului protector al matricei de microîncapsulare asupra compușilor biologic activi, respectiv antociani și flavonoide, s-a studiat comportamentul acestora la tratamentul termic.

Pudra a prezentat o stabilitate ridicată la temperatura de 80°C , cu un procent de conservare al antocianilor cuprins între 99% și 90%, pentru o durată a tratamentului termic cuprinsă între 10 și 30 de minute, care scade la temperaturi mai ridicate, până la maxim 85%.

Flavonoidele au avut un comportament diferit, sugerându-se o degradare a materialului proteic microîncapsulant și eliberarea acestor compuși.

Degradarea antocianilor a urmat un model cinetic de ordinul I, cu valori ale vitezei de degradare (k) cuprinse între $0,41 \pm 0,01 \cdot 10^{-2}$ 1/minut, la temperatura de 80°C și $0,94 \pm 0,11 \cdot 10^{-2}$ 1/minut, la temperatura de 100°C .

Rezultatele au valoare aplicativă, pudra microîncapsulată caracterizându-se printr-un conținut semnificativ de compuși biologic activi, culoare stabilă și stabilitate biochimică ridicată la tratamentul termic, aspecte care permit utilizarea tehnologică în diferite aplicații industriale, cu potențial de dezvoltare a unor produse alimentare cu valoare adăugată, valorificând atât culoarea atractivă cât și capacitatea antioxidantă.

Capitolul 7. Concluzii generale

Teza de doctorat a vizat studiul compușilor polifenolici din fructe roșii, soiuri autohtone (vișine și fructe de soc), din perspectiva caracterizării fitochimice dar și a stabilității compușilor bioactivi, precum și evaluarea comportamentului cinetic și molecular. Pe baza rezultatelor experimentale obținute și a concluziilor parțiale prezentate la finalul fiecărui capitol din partea experimentală, sunt evidențiate sumativ o serie de concluzii generale, după cum urmează:

- Numeroși specialiști studiază în prezent comportamentul structural și funcțional al compușilor bioactivi din surse vegetale, sub formă complexă sau în combinație cu alți compuși naturali, care au o largă variabilitate în funcție de specie, caracteristicile genetice, arealul geografic etc. Clarificarea acestor aspecte necesită studii aprofundate datorită diversității matricilor naturale dar și a caracteristicilor structurale și compoziționale ale compușilor avuți în vedere.
- Fructele roșii studiate din soiuri românești, vișinele (*Prunus cerasus* L.) și fructele de soc (*Sambucus nigra* L.), sunt bogate în compuși polifenolici cu potențial funcțional deosebit. Este important ca activitatea fiziologică a acestor compuși să se mențină și după separarea din matricea naturală sau după procesare. Astfel, cunoașterea potențialului bioactiv și mai ales stabilitatea proprietăților funcționale pe parcursul procesării prezintă o importanță deosebită pentru calitatea produselor comerciale derivate din fructele roșii.
- Extracția și caracterizarea compușilor polifenolici bioactivi din pielețele de fructe studiate au demonstrat potențialul acestora de a fi utilizate ca resurse naturale, cu impact deosebit asupra calității vieții. Prin conținutul ridicat de compuși polifenolici (în principal flavonoide și antociani) și activitatea antioxidantă, soiurile pot concura cu fructele consacrate, și trebuie mai mult promovate în acest sens, prin publicații, brevete și produse comerciale cu proprietăți funcționale deosebite.
- Pentru a analiza modificările compușilor bioactivi în diferite condiții de temperatură au fost evaluate modificările structurale induse de tratamentul termic asupra compușilor bioactivi din extractele de vișine și fructele de soc, cu ajutorul spectroscopiei de fluorescență, a analizelor de separare cromatografică lichidă de înaltă performanță și a studiilor cinetice de degradare termică. În urma analizei cromatografice, extractul din pieleță de vișine a reliefat prezența a patru antociani, cianidin-3-rutinozidul fiind antocianul predominant, urmat de cianidin-3-glucozid, peonidin-3-glucozid, în timp ce în extractul din fructe de soc s-au evidențiat doi compuși antocianici majoritari, pelargonidin-3-soforozid și delfinidin-3-glucozid.
- Modelarea cinetică a fost utilizată pentru estimarea parametrilor cinetici care descriu mecanisme de degradare termică a antocianilor monomerici și a activității antioxidante din extracte, din perspectiva optimizării parametrilor proceselor industriale în vederea menținerii și obținerii unor produse alimentare procesate cu un conținut ridicat de compuși biologic activi și activitate antioxidantă, în condițiile respectării criteriilor de siguranță alimentară.
- Tehnici avansate de investigare (modelarea moleculară, dinamica moleculară, teste de andocare moleculară și spectroscopia de fluorescență) au fost utilizate în premieră pentru caracterizarea și elucidarea mecanismelor de legare dintre moleculele de β -lactoglobulină și compușii polifenolici, cianidin-3-rutinozid (vișine), delfinid-3-glucozid și catehină (soc), ca etape preliminare ale microîncapsulării, cu scopul de a previziona condițiile optime și particularitățile de legare, din perspectiva dezvoltării de compozite cu funcționalitate

predicționată, în special în ceea ce privește activitatea antioxidantă și culoarea imprimată în special de conținutul de antociani.

- Au fost evidențiate particularități și evenimente moleculare specifice induse de tratamentul termic în moleculele de proteine și complexe formate între proteine și antocianii studiați, descrise în general prin fenomene de pliere sau depliere ale lanțurilor polipeptidice, asociate expunerii sau blocării situsurilor de legare, principalii aminoacizi implicați în interacțiuni, distanțe, energii de interacțiune, forțe implicate în interacțiune etc, fenomene care au fost asociate cu stabilitatea termodinamică a complexelor formate.
- Rezultatele obținute au permis exploatarea particularităților structurale ale β -lactoglobulinei de pliere, depliere, reticulare, de microîncapsulare a antocianilor din extractul obținut din pielea de vișine. Au fost obținute trei variante de compozite funcționale diferite ca profil fitochimic, cu un profil superior în ceea ce privește eficiența microîncapsulării și a conținutului de compuși biologic activi pentru varianta reticulată și pentru cea depliată termic. De remarcat este posibilitatea de eliberare și livrare controlată a antocianilor din pudrele microîncapsulate, fiind evidențiat un efect de protecție în sucul gastric și o eliberare controlată în intestin, asociată cu absorbția antocianilor.
- Compozitele rezultate au potențial ridicat de aplicabilitate, fie în dezvoltarea de produse alimentare cu valoare adăugată, cu funcționalitate ridicată, în special exploatând culoarea și activitatea antioxidantă, dar și în domenii conexe, pentru obținerea de nutraceutice sau cosmeceutice.
- Proteinele din zer au fost utilizate în combinație cu diferiți adjuvanți de microîncapsulare, cum ar fi guma acacia în cazul antocianilor din extractele de vișine și pectina în cazul extractelor din fructe de soc. Au rezultat compozite cu un profil diferit și eficiență ridicată de microîncapsulare, de culoare roșu-mov, respectiv mov închis, caracterizate printr-un conținut ridicat de compuși biologic activi și activitate antioxidantă semnificativă, exprimată în mMol/g substanță uscată pudră, cu stabilitate ridicată la procesare.
- Rezultatele obținute au permis îndeplinirea obiectivelor tezei de doctorat, și anume **fundamentarea științifică și tehnologică, printr-o abordare structură-funcție-proces-ingredientă**, necesară pentru dezvoltarea unor compozite funcționale inovative pe bază de proteine din zer și extracte vegetale din fructe roșii, cu accent pe valorificarea compușilor bioactivi din pielea de vișine și a celor din fructele de soc, insuficient exploatate, și care deschide perspective de dezvoltare a unor alimente cu valoare adăugată și/sau funcționale.

Capitolul 8. Contribuții originale și perspective de continuare a cercetărilor

Contribuțiile originale ale tezei de doctorat derivă din următoarele aspecte:

S-a analizat compoziția în compuși biologic activi și activitatea antioxidantă a două categorii de fructe roșii autohtone, vișine și fructe de soc, ambele fructe cu potențial funcțional deosebit pentru utilizarea în alimentație ca atare sau ca produse procesate sub diverse forme. Obținerea de nutraceutice sau cosmeceutice reprezintă, de asemenea, o perspectivă valoroasă. Până în prezent în țara noastră aceste fructe au fost puțin studiate din aceste puncte de vedere ceea ce susține valoarea științifică și aplicativă precum și originalitatea tezei de doctorat.

S-a analizat comportamentul molecular al compușilor polifenolici din pielea vișinelor și a fructelor de soc, ambele fiind soiuri românești, precum și pentru studiul parametrilor cinetici de degradare în perspectiva corelației structură-funcție-proces, în vederea menținerii proprietăților biochimice în produsele finite procesate. Informațiile privind factorii ce determină degradarea

compușilor polifenolici din extractele vegetale, sunt necesare pentru a optimiza condițiile proceselor tehnologice industriale și pentru a minimiza pierderea sau degradarea componentelor bioactive cu rol funcțional.

S-au utilizat tehnici moderne de investigare biochimică (spectroscopia de fluorescență și tehnici de modelare moleculară) pentru a studia stabilitatea termică a complexelor antociani-proteine în vederea formulării unor ingrediente funcționale. Astfel, se profilează ideea utilizării produselor derivate (extracte, pudre) ca ingrediente funcționale pentru formularea unor produse alimentare diverse (băuturi, produse de panificație, produse lactate fermentate, produse de patiserie și cofetărie, produse zaharoare etc) și a unor produse pentru creșterea calității vieții (nutraceutice și cosmeceutice).

Capitolul 9. Diseminarea rezultatelor

Diseminarea rezultatelor cercetărilor efectuate pe întreaga durată a studiilor doctorale s-au concretizat în următoarele lucrări științifice publicate sau comunicate la conferințe naționale și internaționale după cum urmează:

A. Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **Oancea, Ana-Maria**, Hasan, Mahadi, Vasile, Aida Mihaela, Barbu, Vasilica, Ioniță, Elena, Bahrim, Gabriela, Râpeanu, Gabriela, Silvi, Stefania, Stănciuc, Nicoleta, 2018. *Functional evaluation of microencapsulated anthocyanins from sour cherries skins extract in whey proteins isolate*. LWT - Food Science and Technology, 95, 129–134. Factor de impact: 3,714.
2. Stănciuc, Nicoleta, **Oancea, Ana-Maria**, Aprodu, Iuliana, Turturică, Mihaela, Barbu, Vasilica, Ioniță, Elena, Râpeanu, Gabriela, Bahrim, Gabriela, 2018. *Investigations on binding mechanism of bioactives from elderberry (Sambucus nigra L.) by whey proteins for efficient microencapsulation*. Journal of Food Engineering, 223, 197-207. Factor de impact: 3,625.
3. **Oancea, Ana-Maria**, Aprodu, Iuliana, Ghinea, Ioana Otilia, Barbu, Vasilica, Ioniță, Elena, Bahrim, Gabriela, Râpeanu, Gabriela, Stănciuc, Nicoleta, 2017. *A bottom-up approach for encapsulation of sour cherries anthocyanins by using b-lactoglobulin as matrices*. Journal of Food Engineering, 210, 83-90. Factor de impact: 3,099.
4. **Oancea, Ana-Maria**, Aprodu, Iuliana, Râpeanu, Gabriela, Bahrim, Gabriela, Stănciuc, Nicoleta, 2017. *The Binding mechanism of anthocyanins from sour cherries (Prunus cerasus L) skins to bovine β -lactoglobulin: A fluorescence and in silico-based approach*. International Journal of Food Properties, 20(3), S3096-S3111. Factor de impact: 1,427.
5. Coman, Maria Magdalena, **Oancea, Ana-Maria**, Verdenelli, Maria Cristina, Cecchini, Cinzia, Bahrim, Gabriela, Orpianesi, Carla, Cresci, Alberto, Silvi, Stefania, 2017. *Polyphenol content and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and prebiotic properties of red fruit extracts*. European Food Research and Technology, 244, 735-745. Factor de impact: 2,056.
6. **Oancea, Ana-Maria**, Onofrei, Cristina, Turturică, Mihaela, Bahrim, Gabriela, Râpeanu, Gabriela, Stănciuc, Nicoleta, 2017. *The kinetics of thermal degradation of polyphenolic compounds from elderberry (Sambucus nigra L.) extract*. Food Science and Technology International, 24(4):361-369. Factor de impact: 0,73.
7. **Oancea, Ana-Maria**, Turturică, Mihaela, Bahrim, Gabriela, Râpeanu, Gabriela, Stănciuc, Nicoleta, 2017. *Phytochemicals and antioxidant activity degradation kinetics during thermal treatments of sour cherry extract*. LWT - Food Science and Technology, 82, 139-146. Factor de impact: 2,329.

B. Articole publicate în reviste indexate în baze de date internaționale

1. **Oancea, Ana Maria**, Stănciuc, Nicoleta, Râpeanu, Gabriela, Aprodu, Iuliana, Bahrim Gabriela, 2016. *Binding properties of β -lactoglobulin with polyphenols – a review*. The Annals Of The University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI – Food Technology, 40(2), 9-19.
2. Turturică, Mihaela, **Oancea, Ana Maria**, Râpeanu, Gabriela, Bahrim, Gabriela, 2015. *Anthocyanins: naturally occurring fruit pigments with functional properties*. The Annals Of The University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI – Food Technology, 39(1), 9-24.

C. Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale

1. **Oancea, Ana Maria**, Stănciuc, Nicoleta, Bahrim, Gabriela, Râpeanu, Gabriela, Aprodu, Iuliana, 2018. *Study of binding mechanism between sour cherry (*Prunus cerasus* L.) extract and β -lactoglobulin using fluorescence spectroscopy*, 2nd International Conference on Food and Agriculture Technologies – ICFAT 2018, 18-20 ianuarie 2018, Jeju, Coreea de Sud.
2. **Oancea, Ana Maria, Ghinea, Ioana Otilia, Barbu, Viorica**, Bahrim Gabriela, Râpeanu Gabriela, Ioniță, Elena, Aprodu, Iuliana, Stănciuc Nicoleta, 2017. *Freeze-Drying Microencapsulation of Anthocyanins from Sour Cherries in the β -Lactoglobulin Matrices*, European Biotechnology Congress 2017, 25 – 27 Mai, Dubrovnik, Croatia.
3. **Oancea, Ana Maria**, Stănciuc, Nicoleta, Aprodu, Iuliana, Râpeanu Gabriela, Bahrim Gabriela, 2017. *Study of binding mechanism between sour cherry (*Prunus cerasus* L.) extract and β -lactoglobulin using fluorescence spectroscopy*, The 8th International Symposium EuroAliment, 7-8 septembrie, Galați, România.
4. **Oancea, Ana Maria**, Turturică Mihaela, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta, 2016. *Anthocyanins thermal degradation in sour cherry extract on fluorescence spectroscopy and kinetic modeling basis*, 8th Congress Pigments in Food "Coloured food for health benefits", 28 Iunie – 1 Iulie, Cluj-Napoca, România.
5. **Oancea, Ana Maria**, Stănciuc, Nicoleta, Râpeanu Gabriela, 2016. *Probing the ability of bovine β -lactoglobulin to binds anthocyanins from sour cherries extract by quenching experiments*, 15th International Symposium Prospects for the 3rd Millennium Agriculture, 25-28 septembrie, Cluj Napoca, Romania.
6. **Oancea, Ana Maria**, Coman, Maria Magdalena, Verdenelli, Cristina Maria, Silvi, Stefania, Cecchini, Cinzia, Bahrim, Gabriela, Orpianesi, Carla, Cresci, Alberto, 2015. *Polyphenols and anthocyanins content and in vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of several fruits*, The 8th International Symposium EuroAliment, Universitatea "Dunărea de Jos", 24-26 septembrie, Galați, Romania.

D. Lucrări comunicate la manifestări științifice naționale

1. **Oancea, Ana Maria**, Stănciuc, Nicoleta, Vasile, Aida, Râpeanu, Gabriela, Aprodu, Iuliana, Bahrim, Gabriela, 2018. *The Effect of the Microencapsulated Sour Cherry Extract in Whey Protein Isolate Matrix on the *Lactobacillus Casei* 431® Probiotic Strain*, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ - Galați CSSD-UDJG 2018, 7-8 iunie, Galați, România.
2. **Oancea, Ana Maria**, Stănciuc Nicoleta, Râpeanu Gabriela, Aprodu, Iuliana, Bahrim Gabriela, 2017. *Fluorescence spectroscopy as a tool to evaluate the pH-induced conformational changes of the complexes formed between β -lactoglobulin/ α -lactalbumin and sour cherry extract*. Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG 2017, 8-9 iunie, Galați, România.
3. **Oancea, Ana Maria**, Stănciuc, Nicoleta, Râpeanu, Gabriela, Bahrim, Gabriela, 2016. *Thermal degradation of phytochemicals and the effect on the antioxidant activity of sour cherry*. Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG 2016, 2-3 iunie, Galați, România.
4. Turturică, Mihaela, **Oancea, Ana Maria**, Bahrim, Gabriela, Râpeanu, Gabriela, Stănciuc, Nicoleta, Aprodu, Iuliana, 2014. *Evaluation of phenolic potential from regional fruits*. Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG 2014, 15-16 mai, Galați, România.