

**Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați**  
**Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești**



# **REZUMAT**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**Doctorand,**

Florentina-Mihaela URSACHE (STRÎMBEI)

**Conducător științific,**

Prof.univ.dr.ing Elisabeta BOTEZ

**Seria I.7: INGINERIA PRODUSELOR ALIMENTARE Nr. 6**

**GALAȚI**  
**2018**



## **REZUMAT**

# **Compozite funcționale pe bază de extracte de cătină (*Hippophae rhamnoides*) cu obținerea unor produse alimentare cu valoare adăugată**

**Doctorand,**  
**Florentina-Mihaela URSACHE (STRÎMBEI)**

### **Conducător științific**

Prof.univ.dr.ing. Elisabeta BOTEZ

### **Referenți științifici**

Prof. univ. dr. biochim. Simona OANCEA  
Conf. univ. dr. Francisc Vasile DULF  
Prof. univ. dr. ing. Nicoleta STĂNCIUC

**Seria I.7: INGINERIA PRODUSELOR ALIMENTARE Nr. 6**

**GALAȚI**  
**2018**

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

	Pagină teză	Pagină rezumat
Introducere.....	2	2
1. Fructele de <i>Hippophae rhamnoides</i> – sursă de compuși bioactivi.....	9	-
1.1. Aspecte generale.....	9	-
1.2. Caracterizare morfologică și biologică.....	10	-
1.3. Clasificarea botanică.....	10	-
1.4. Considerații teoretice privind compușii bioactivi funcționali din <i>H. rhamnoides</i> .....	11	-
1.4.1. Fenoli.....	11	-
1.4.2. Flavonoide.....	12	-
1.4.3. Carotenii.....	13	-
1.4.3.1. Beneficiile carotenilor.....	14	-
1.4.3.2. Influența formelor izomerice asupra biodisponibilității și bioactivității.....	18	-
1.4.3.3. Oxidarea carotenilor.....	19	-
1.4.3.4. Autooxidarea.....	21	-
1.4.3.5. Degradarea termică.....	21	-
2. Proteinele zerului.....	24	-
2.1. Aspecte generale.....	24	-
2.2. Caracterizarea generală a principalelor proteine din zer.....	24	-
2.2.1. $\beta$ -Lactoglobulina.....	24	-
2.2.2. $\alpha$ -Lactalbumina.....	25	-
2.2.3. Imunoglobulinele.....	26	-
2.2.4. Lactoferina.....	27	-
2.3. Proteinele din zer – sursă de peptide bioactive.....	27	-
2.4. Interacțiunea proteinelor din zer cu micronutrienți.....	29	-
3. Microîncapsularea.....	31	-
3.1. Aspecte generale.....	31	-
3.2. Tehnici de microîncapsulare.....	31	-
3.2.1. Procesul de încapsulare prin coacervare.....	35	-
3.2.2. Parametrii care influențează formarea coacervatelor.....	36	-
3.2.3. Caracteristicile fizico-chimice ale microcapsulelor.....	36	-
3.3. Referințe bibliografice.....	38	-
4. Profilul fitochimic al extractului de cătină albă și descrierea mecanismelor.... de degradare termică a compușilor biologic activi pe baze cinetice.....	52	4
4.1. Introducere.....	52	4
4.2. Obiectivele studiului.....	52	-

Compozite funcționale pe bază de extracte de cătină (*Hippophae rhamnoides*) cu obținerea unor produse alimentare cu valoare adăugată

4.3. Materiale.....	53	-
4.4. Echipamente.....	53	-
4.5. Metode.....	54	-
4.5.1. Extracția carotenozilor din fructele de cătină.....	54	-
4.5.2. Determinarea conținutului de carotenoizi totali (TCC) din fructele de cătină.....	54	-
4.5.3. Determinarea conținutului de polifenoli totali.....	55	-
4.5.4. Determinarea conținutului de flavonoide.....	55	-
4.5.5. Determinarea activității antioxidante.....	56	-
4.5.6. Analiza cromatografică a carotenilor din extractul de cătină ( <i>H. rhamnoides</i> ) .....	57	-
4.5.7. Tratamentul termic.....	57	-
4.5.8. Spectroscopie de fluorescență.....	57	-
4.5.9. Spectroscopie FT-IR.....	57	-
4.5.10. Modele cinetice de degradare termică.....	58	-
4.5.11. Analiza statistică a datelor.....	58	-
4.6. Rezultate și discuții.....	59	4
4.6.1. Analiza calitativă și cantitativă a principalilor compuși din cătină ( <i>H. rhamnoides</i> ) prin HPLC.....	59	4
4.6.2. Spectrele IR.....	61	6
4.6.3. Evaluarea modificărilor structurale ale compușilor bioactivi din extractul din <i>H. rhamnoides</i> induse de tratamentul termic.....	61	7
4.6.4. Studii de degradare termică a compușilor bioactivi din extractele de cătină ( <i>H. rhamnoides</i> ) .....	66	7
4.6.4.1. Conținutul de carotenoizi totali.....	66	7
4.6.4.2. Conținutul de polifenoli totali.....	68	8
4.6.4.3. Conținutul de flavonoide totale.....	69	9
4.6.4.4. Activitatea antioxidantă.....	70	10
4.7. Concluzii parțiale.....	72	11
4.8. Referințe bibliografice.....	73	-
5. Studii avansate de evaluare a mecanismelor de legare dintre compușii carotenoidici din extractul de cătină și proteinele zerului.....	76	13
5.1. Evaluarea mecanismului de legare dintre $\alpha$ -lactalbumina și compușii carotenoidici din extractul de cătină și evaluarea stabilității complexului în diferite condiții de mediu.....	76	13
5.1.1. Introducere.....	76	13
5.1.2. Obiectivele studiului.....	77	-
5.1.3. Materiale.....	78	13
5.1.4. Metode.....	78	-
5.1.4.1. Extracția $\beta$ -carotenului din fructele de cătină liofilizate.....	78	-
5.1.4.2. Determinarea conținutului total de carotenoizi (TCC) din extract.....	78	-

Compozite funcționale pe bază de extracte de cătină (*Hippophae rhamnoides*) cu obținerea unor produse alimentare cu valoare adăugată

5.1.4.3. Tratamentul izotermic.....	78	-
5.1.4.4. Tehnici de spectroscopie de fluorescență.....	78	-
5.1.4.5. Spectroscopia de absorbție UV-vis.....	80	-
5.1.4.6. Procedurile de dinamică, andocare și rafinare moleculară.....	80	-
5.1.4.7. Analize statistice.....	81	-
5.1.5. Rezultate și discuții.....	81	13
5.1.5.1. Studiul capacității $\alpha$ -LA de a lega carotenoizi în sisteme model.....	81	13
5.1.5.2. Studiul influenței tratamentului termic asupra stabilității complexului format între $\alpha$ -LA și carotenoizii din extractul de cătină.....	90	20
5.1.5.3. Parametri termodinamici pentru complexul $\alpha$ -LA-EC.....	96	21
5.1.5.4. Investigarea <i>in silico</i> privind interacțiunea dintre $\alpha$ -LA și $\beta$ -caroten, la nivelul de moleculă unică.....	97	22
5.2. Evaluarea mecanismului de legare dintre $\beta$ -lactoglobulina și compușii carotenoidici din extractul de cătină și evaluarea stabilității complexului în diferite condiții de mediu.....	100	25
5.2.1. Introducere.....	100	25
5.2.2. Obiectivele studiului.....	100	25
5.2.3. Materiale.....	100	25
5.2.4. Metode.....	100	-
5.2.4.1. Extracția $\beta$ -carotenului din fructele de cătină liofilizate.....	100	-
5.2.4.2. Determinarea conținutului total de carotenoizi (TCC) din fructele de cătină.....	101	-
5.2.4.3. Experimente de quenching cu $\beta$ -caroten.....	101	-
5.2.4.4. Prepararea complexului $\beta$ -LG-EC.....	101	-
5.2.4.5. Tratament termic.....	101	-
5.2.4.6. Tehnici de spectroscopie de fluorescență.....	101	-
5.2.4.7. Experimentele de quenching a complexului $\beta$ -LG-EC cu acrilamidă și iodură de potasiu.....	101	-
5.2.4.8. Procedurile de dinamică, andocare și rafinare moleculară.....	102	-
5.2.5. Rezultate și discuții.....	102	25
5.2.5.1. Studiul capacității $\beta$ -LG de a lega carotenoizi în sisteme model.....	102	25
5.2.5.2. Studiul influenței tratamentului termic asupra stabilității complexului format între $\beta$ -LG-EC.....	104	27
5.2.5.3. Studii de quenching cu acrilamidă și iodură de potasiu pentru complexul $\beta$ -LG-EC.....	111	-
5.2.5.4. Investigarea <i>in silico</i> privind interacțiunea dintre $\beta$ -LG și $\beta$ -caroten, la nivelul de moleculă unică.....	114	29
5.2.5.5. Studiul influenței pH-ului asupra stabilității complexului format între $\beta$ -LG-EC.....		-
5.3. Concluzii parțiale.....	121	30

Compozite funcționale pe bază de extracte de cătină (*Hippophae rhamnoides*) cu obținerea unor produse alimentare cu valoare adăugată

5.4. Referințe bibliografice.....	124	-
6. Microîncapsularea compușilor carotenoidici din extractul de cătină albă în proteine din zer din perspectiva dezvoltării unor compozite funcționale cu aplicații în industria alimentară.....	130	33
6.1. Introducere.....	130	33
6.2. Obiectivele studiului.....	132	33
6.3. Materiale.....	132	33
6.4. Echipamente.....	132	-
6.5. Metode.....	133	33
6.5.1. Extracția carotenoizilor din fructele de cătină liofilizate.....	133	-
6.5.2. Determinarea conținutului total de carotenoizi (TCC) din extract.....	133	-
6.5.3. Determinarea activității antioxidante.....	133	-
6.5.4. Obținerea microcapsulelor.....	133	33
6.5.5. Eficiența încapsulării (EI).....	134	-
6.5.6. Microscopie confocală.....	134	-
6.5.7. Analiza FT-IR.....	135	-
6.6. Rezultate și discuții.....	135	33
6.6.1. Caracterizare fitochimică a extractului de încapsulat.....	135	34
6.6.2. Eficiența încapsulării.....	135	34
6.6.3. Caracterizarea pudrei microîncapsulate.....	136	34
6.6.4. Structura și morfologia microcapsulelor.....	136	34
6.6.5. Analiza FT-IR.....	137	35
6.7. Concluzii parțiale.....	138	36
6.8. Referințe bibliografice.....	139	-
7. Dezvoltarea unor tehnologii de obținere a produselor alimentare cu valoare adăugată prin exploatarea potențialului bioactiv al cătinei albe și a complexului carotenoidic microîncapsulat.....	142	38
7.1. Aspecte generale.....	142	-
7.2. Obiectivele studiului.....	143	-
7.3. Materiale și metode.....	143	-
7.3.1. Obținerea produsului lactat tip desert pe bază de concentrat proteic din zer și cătină.....	143	38
7.3.2. Obținerea brișelor cu valoare adăugată.....	144	38
7.3.3. Determinarea caracteristicilor fizico-chimice.....	144	-
7.3.4. Determinarea conținutului de carotenoizi.....	144	-
7.3.5. Determinarea activității antioxidante.....	145	-
7.3.6. Analiza instrumentală a texturii produsului tip desert pe bază de concentrat proteic din zer și cătină.....	145	-
7.3.6. Analiza instrumentală a texturii produsului tip desert pe bază de concentrat proteic din zer și cătină.....	146	-
7.3.7. Analiza instrumentală a texturii brișelor cu valoare adăugată.....	146	-

Compozite funcționale pe bază de extracte de cătină (*Hippophae rhamnoides*) cu obținerea unor produse alimentare cu valoare adăugată

7.3.8. Studii colorimetrice.....	147	-
7.3.9. Stabilitatea brișelor la depozitare și determinarea termenului de valabilitate.....	147	-
7.3.10. Analize statistice.....	147	-
7.4. Rezultate și discuții.....	147	39
7.4.1. Caracterizarea fizico-chimică și funcțională a produsului lactat tip desert pe bază de cătină și concentrat proteic din zer.....	147	39
7.4.1. Caracterizarea fizico-chimică și funcțională a produsului lactat tip desert pe bază de cătină și concentrat proteic din zer.....	147	39
7.4.2. Analiza texturală a produselor lactate pe bază de concentrat proteic și cătină.....	148	39
7.4.3. Caracterizarea funcțională și fizico-chimică a brișelor cu valoare adăugată.....	150	41
7.4.4. Analiza texturală a brișelor.....	153	42
7.4.5. Analiza senzorială.....	153	-
7.4.6. Evaluarea stabilității la depozitare a brișelor cu valoare adăugată.....	155	43
7.5. Concluzii parțiale.....	158	44
7.6. Referințe bibliografice.....	159	-
8. Concluzii generale.....	160	45
9. Contribuții originale și perspective de continuare a cercetărilor.....	162	47
Diseminarea rezultatelor cercetărilor.....	163	48



## Introducere

Compușii bioactivi prezintă un interes major pentru cercetători și pentru industria alimentară, deoarece acești compuși prezintă foarte multe efecte benefice pentru sănătate. Numeroase studii au evidențiat că un consum regulat de produse bogate în polifenoli, respectiv în caroteni poate fi corelat cu riscul redus de boli cronice.

Promovarea unui stil de viață sănătos a condus, în ultimii ani, la o creșterea explozivă a interesului consumatorilor pentru produsele funcționale, cu efecte benefice pentru sănătate. Astfel, cercetătorii și producătorii din industria alimentară încearcă să valorifice cât mai mult compușii bioactivi și să diversifice gama de produse alimentare.

Fructele de cătină (*Hippophae rhamnoides*) reprezintă o sursă importantă de compuși bioactivi, precum: vitamine (C și E), carotenoide ( $\alpha$ -caroten, licopen, luteină și zeaxantină), flavonoide (isoramnetin, quercetin, kampferol) acizi organici, aminoacizi, micro și macronutrienți (Yang și Kallio, 2001; Kallio și al., 2002). Componentele bioactive din fructe, în general, variază în funcție de maturitatea fructelor, de mărimea acestora, de specie și de zona geografică (Zeb, 2004; Leskinen și al., 2010).

Alegerea temei de doctorat "Compozite funcționale pe bază de extracte de cătină (*Hippophae rhamnoides*) cu obținerea unor produse alimentare cu valoare adăugată" s-a bazat pe două motive. Primul motiv este faptul că fructele de cătină își pierd din proprietăți dacă nu sunt transportate și depozitate corespunzător. Costurile de depozitare sunt foarte mari și distribuția lor în cantități mari în rețeaua de magazine nu este posibilă, deoarece vânzarea acestor fructe poate dura chiar și săptămâni, ceea ce ar duce la pierderea proprietăților benefice pentru organism. Astfel, consumatorii nu ajung să se bucure de beneficiile acestor fructe. Cel de-al doilea motiv îl reprezintă gustul astringent care face ca aceste fructe să fie greu acceptate de consumatori.

Teza de doctorat intitulată "Compozite funcționale pe bază de extracte de cătină (*Hippophae rhamnoides*) cu obținerea unor produse alimentare cu valoare adăugată" a urmărit identificarea și investigarea compușilor bioactivi din *H. rhamnoides*, dar și valorificarea acestora. Aceste fructe sunt bogate în compuși bioactivi ce prezintă o serie de efecte benefice datorită proprietăților antioxidante.

Identificarea și investigarea conformațională și structurală a compușilor bioactivi din diferite vegetale conduc la optimizarea proceselor tehnologice, astfel încât să se asigure funcționalitatea produselor alimentare. Astfel, tema tezei de doctorat prezintă importanța pentru industria alimentară

Principalele obiective științifice ale studiului de cercetare efectuat în timpul perioadei de doctorat au fost:

- Identificarea și determinarea conținutului fitochimic a extractelor din fructele de cătină (*H. rhamnoides*), precum și evaluarea stabilității compușilor biologic activi pentru a stabili condițiile optime de obținere și păstrare a produselor bogate în acești compuși:
  - ☞ extracție, caracterizare prin identificarea și cuantificarea compușilor fitochimici din extractul de cătină;
  - ☞ investigarea stabilității compușilor bioactivi din cătină (*H. rhamnoides*) la diferite regimuri termice (în intervalul de temperatură de la 50 la 100°C, cu o durată diferită

- de menținere 0-25 min) asupra conținutului total de carotenoizi, a conținutului total de polifenoli, a conținutului total de flavonoide, precum și asupra capacităților antioxidante ale extractelor de cătină;
- Evaluarea mecanismului de legare a compușilor biologic activi din extractul de cătină cu proteinele din zer din perspectiva obținerii unor componente funcționale
    - ✦ investigarea mecanismelor de legare dintre principalele proteine din zer ( $\beta$ -LG și  $\alpha$ -LA) și carotenoizii din extractele de cătină;
    - ✦ evaluarea stabilității complexelor formate în diferite condiții de pH și tratament termic utilizând experimente de quenching, spectroscopie UV-vis și tehnici *in silico*.
  - Microîncapsularea compușilor carotenoidici din extractul de cătină albă cu scopul de a stabili ce schimbări apar în structura particulelor, dar și utilizarea acestor particule la obținerea de produse alimentare
    - ✦ microîncapsularea componentelor lipofile (carotenoizi din extractul de cătină albă) folosind ca material încapsulant proteinele din zer (izolat proteic din zer);
    - ✦ determinarea conținutului de carotenoizi din microparticule și a eficienței încapsulării;
    - ✦ identificarea schimbărilor apărute în structura particulelor utilizând analiza spectrală FT-IR și microscopia confocală.
  - Obținerea a două produse cu valoare adăugată prin adaos de componente funcționale pe bază de protiene din zer și cătină
    - ✦ stabilirea rețetelor tehnologice de obținere a produselor,
    - ✦ analiza comparativă a caracteristicilor fizico-chimice și de textură ale produselor.

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

- I. **STUDIUL DOCUMENTAR** este împărțit în 3 capitole ce prezintă sintetizat diferite considerații teoretice din literatura de specialitate referitoare la compușii bioactivi din *H. rhamnoides* și despre proteinele din zer. De asemenea, sunt redată și beneficiile carotenilor și a proteinelor din zer asupra sănătății.
- II. **STUDIUL EXPERIMENTAL** cuprinde 4 capitole în care sunt evidențiate rezultatele studiilor de cercetare realizate pe parcursul stagiului doctoral:

**Capitolul 4**, intitulat ***Profilul fitochimic al extractului de cătină albă și descrierea mecanismelor de degradare termică a compușilor biologic activi pe baze cinetice*** prezintă extracția, separarea, identificarea și cuantificarea compușilor carotenoidici, precum și caracterizarea biochimică a compușilor bioactivi (caroten, polifenoli și flavonoide) din fructele de cătină (*H. rhamnoides*) utilizând metode spectrofotometrice și tehnici de cromatografie lichidă (HPLC) precum și FT-IR.

**Capitolul 5**, intitulat ***Studii avansate de evaluare a mecanismelor de legare dintre compușii carotenoidici din extractul de cătină și proteinele zerului***, prezintă obținerea complexului  $\alpha$ -lactalbumină-extract de cătină și a complexului  $\beta$ -lactoglobulină-extract de cătină, evaluarea modificărilor structurale ale complexelor, induse de temperatură și pH.

**Capitolul 6**, intitulat ***Microîncapsularea compușilor carotenoidici din extractul de cătină albă în proteine din zer din perspectiva dezvoltării unor compozite funcționale cu aplicații în industria alimentară***, prezintă metoda de microîncapsulare a componentelor lipofile din

extractul de cătină folosind ca material încapsulant proteinele din zer, identificarea schimbărilor ce apar în structura particulelor utilizând analiza spectrală FT-IR și microscopia confocală.

**Capitolul 7**, intitulat **Dezvoltarea unor tehnologii de obținere a produselor alimentare cu valoare adăugată prin exploatarea potențialului bioactiv al cătinei albe și a complexului carotenoidic microîncapsulat**, presupune elaborarea a două tehnologii pentru brevetarea a două produse cu valoare adăugată care exploatează potențialul funcțional al cătinei și al extractului de cătină microîncapsulat.

Fiecare capitol al studiului experimental cuprinde următoarele subcapitole: *Introducere*, *Obiectivele studiului realizat*; *Materiale și metode*, *Rezultate și discuții*, *Concluzii parțiale și Referințe bibliografice*.

**Capitolul 8, Concluzii generale**, prezintă principalele concluzii rezultate în urma experimentelor realizate.

Teza de doctorat cuprinde 174 pagini, în care sunt incluse 75 figuri și 25 tabele. Studiul documentar reprezintă 25 %, iar partea experimentală 75 %.

În final, sunt evidențiate contribuțiile originale ale tezei de doctorat și diseminarea rezultatelor obținute în domeniul de cercetare abordat. Astfel, rezultatele cercetărilor au fost valorificate prin elaborarea a 8 articole științifice, publicate sau în curs de publicare, 7 articole în reviste cotate ISI (Journal of Food Chemistry, Journal of Macromolecular Science, Part A - Pure and Applied Chemistry, Journal of Molecular Structure, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, Journal of Food Engineering) și 1 articol indexat în baze de date internaționale (The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI – Food Technology). Rezultatele obținute au fost valorificate și prin realizarea a două brevete de invenție înregistrate la OSIM. De asemenea, rezultatele au fost prezentate și la 8 conferințe internaționale și naționale.

Efectuarea experimentelor din cadrul tezei de doctorat a fost posibilă datorită infrastructurii *Centrului integrat de cercetare, expertiză și transfer tehnologic (BioAliment-TehnIA)* ([www.bioaliment.ugal.ro](http://www.bioaliment.ugal.ro)), din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați.

Pe parcursul studiilor doctorale am făcut parte din echipa de cercetare a proiectului PN-II-RU-TE-2014-4-0115/2015-2017 ([www.funfood.ugal.ro](http://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 comisiei de îndrumare cu următoarea componență:

- **Prof.dr.ing. Elisabeta Botez** – conducător de doctorat
- **Prof.dr.ing. Nicoleta STĂNCIUC** – coordonator studii de analiză spectrofluorimetrică și cinetica de degradare a compușilor polifenolici
- **Prof.dr.ing. Iuliana APRODU** – coordonator studii de modelare și andocare moleculară
- **Prof. dr. chim. DINICĂ RODICA** – coordonator studii de extracție.

## 4. Profilul fitochimic al extractului de cătină albă și descrierea mecanismelor de degradare termică a compușilor biologic activi pe baze cinetice

### 4.1. Introducere

Fructele de *H. rhamnoides* (cătină) au un conținut mare de carotenoizi. Carotenii exercită o serie de acțiuni benefice asupra organismului uman, de exemplu: pot reduce riscul de cataractă și previn bolile oculare (Michael și al., 2011), a declinului cognitiv (Plasman și al., 2010), a progresiei bolilor cronice corelate cu obezitatea (Roberts și al., 2009; Ford și al., 2003), întârzie progresarea bolilor cardiovasculare și a diabetului (Boon, 2010; Palozza și al., 2011; Gouranton și al., 2011).

Identificarea și investigarea conformațională și structurală a compușilor bioactivi din diferite vegetale conduc la optimizarea proceselor tehnologice, astfel încât să se asigure funcționalitatea produselor alimentare.

Acest studiu a urmărit extracția, caracterizarea prin identificarea și cuantificarea compușilor fitochimici din extractul de cătină și investigarea stabilității compușilor bioactivi din cătină (*H. rhamnoides*) la diferite regimuri termice din perspectiva utilizării ca ingrediente în produse alimentare sau nutraceutice. Pentru a descrie modificările ce apar în urma tratamentului termic (în intervalul de temperatură de la 50 la 100°C, cu o durată diferită de menținere 0-25 min) asupra conținutului total de carotenoizi (TCC), a conținutului total de polifenoli (TPC), a conținutului total de flavonoide (TFC), precum și asupra capacităților antioxidante ale extractelor de cătină, s-au realizat studii ce au la bază o abordare cantitativă.

Fluorescența este o tehnică neinvazivă care a fost utilizată pentru a extinde posibilitățile de analiză și înregistrare a modificărilor compușilor bioactivi din extractul de cătină (*H. rhamnoides*).

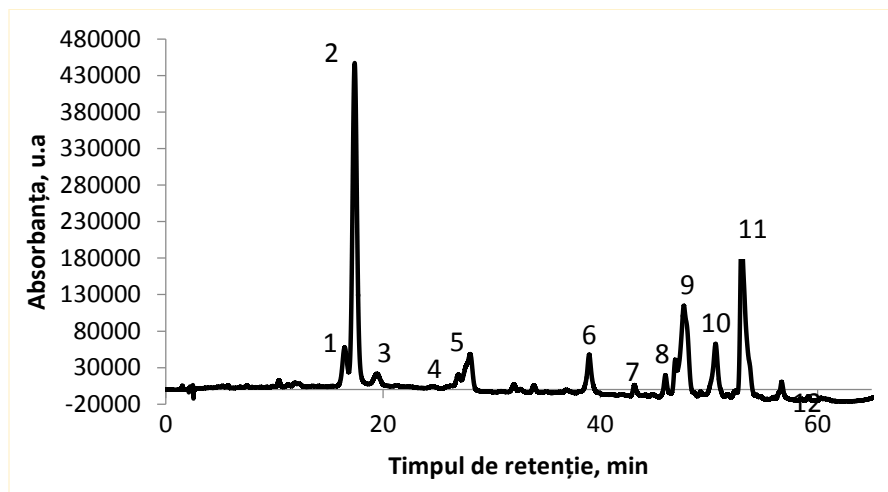
Spectroscopia FT-IR a fost utilizată pentru a obține mai multe informații despre complexitatea compozițională a extractului și pentru a evalua comportamentul termic a acestuia.

### 4.2. Rezultate și discuții

#### 4.2.1. Analiza calitativă și cantitativă a principalilor compuși din cătină (*H. rhamnoides*) prin HPLC

Analiza HPLC s-a realizat prin compararea timpilor de retenție a carotenoizilor din probele luate în studiu cu cele ale standardelor, precum și cu datele din literatură.

În figura 4.7. este prezentată cromatograma HPLC a carotenoizilor identificați și cuantificați în extractul de cătină. Au fost identificați 12 compuși, după cum urmează: astaxantina (peak 1), zeaxantina (peak 2), zeaxantina-palmitat (peak 3),  $\gamma$ -caroten (peak 4), cis  $\beta$ -caroten (peak 5),  $\beta$ -criptoxantina (peak 6), licopen (peak 7), luteină-palmitat-miristat (peak 8), luteină di-palmitat (peak 9),  $\beta$ -caroten (peak 10),  $\alpha$ -caroten (peak 11), și zeaxantină di-palmitat (peak 12).  $\beta$ -carotenul a prezentat un conținut de 15,19 mg/g s.u., urmat de astaxantină cu 11,94 mg/g s.u.,  $\beta$ -criptoxantină cu 8,93 mg/g s.u. și licopen cu 2,24 mg/g s.u., în timp ce zeaxantina a fost identificată în cea mai mare cantitate de 81,29 mg/g s.u.



**Figura 4.7.** Cromatograma HPLC pentru identificarea și cuantificarea carotenoizilor din extractul de cătină (Ursache și al., 2017)

Rezultatele obținute sunt asemănătoare cu cele raportate de Pop și al. (2014) care au sugerat un conținut de  $\beta$ -caroten între 1,9 și 7,4 mg/100 g s.u.,  $\beta$ -criptoxantină (1,3-1,6 mg/100 g su), licopen (1,4-2,3 mg/100 g s.u.) și zeaxantină (1,8-2,5 mg/100 g s.u.) în șase varietăți de cătină din România. Andersson și al. (2009) a sugerat valori relative de diferiți carotenoizi în fructele de cătină de: 1% luteină, 8% zeaxantină, 0,3%  $\beta$ -criptoxantină, 8% licopen, 4%  $\gamma$ -caroten, 14%  $\beta$ -caroten și 10% carotenoizi minori.

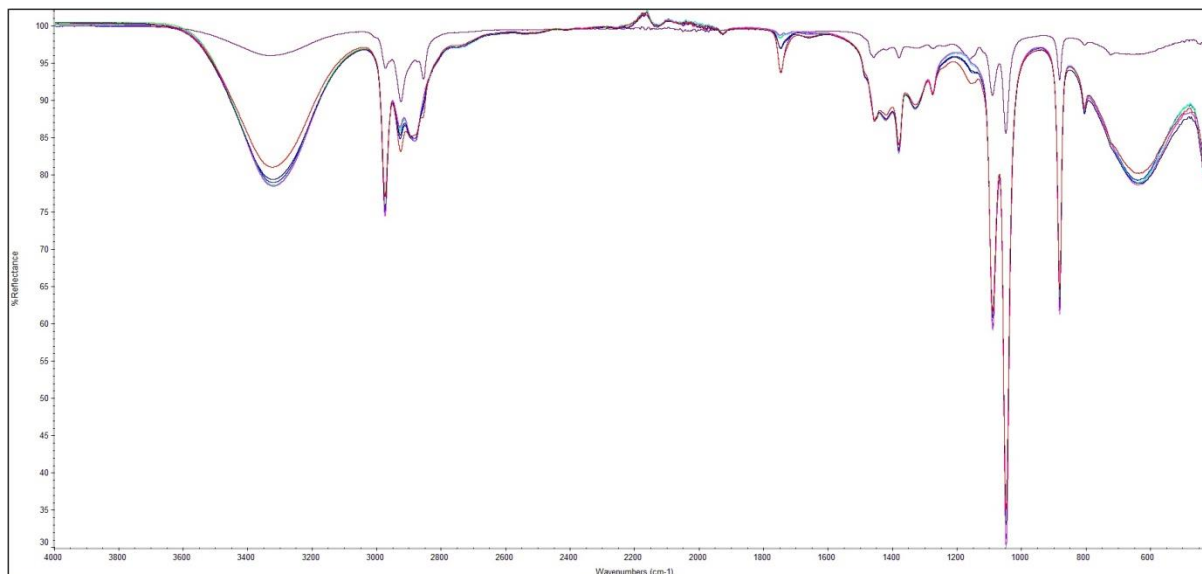
În tabelul 4.2. este realizată o analiză comparativă cu datele din literatura de specialitate în ceea ce privește conținutul de compuși biologic activi din extractele de cătină.

**Tabelul 4.2.** Conținutul de compuși bioactivi din *H. rhamnoides*

Compuși bioactivi cătină	Ursache și al. (2017)	Rezultate raportate în literatura de specialitate	Referințe
<b>Polifenoli totali</b>	140,14 ± 6,64 mg AG/g s.u.	28,35±1,31 mg/g	Kumar și al. (2011)
		9,64 -107,04 mg AG/g s.u.	Korekar și al. (2014)
<b>Flavonoide totale</b>	5,04 ± 0,05 mg EC/ g s.u.	345-854 mg/100 mg	Yuzhen și al. (1997)
		6,79±0,30 mg rutin/g	Chauhan și al. (2012)
		14,14±1,12- 6,40±2,36 mg rutin/g s.u	Kumar și al. (2011)
<b>Activitatea antioxidantă</b>	33,7±0,29%	94,7±3,2 pentru extract alcoolic	Papuc și al. (2008)
		74,7±2,6 extract apă-acetonă	
<b><math>\beta</math>-caroten</b>	38,34 ± 5,71 mg/g s.u.	1,5 – 18,5 mg/100 g	Andersson și al. (2009)
		9,4-34,5 mg/100 g	Beveridge și al. (1999)
		0,53 – 0,97 mg/g s.u	Pop și al. (2014)

#### 4.2.2. Spectrele IR

În figura 4.8. sunt redate spectrele ATR-FTIR ale extractului de cătină după tratament termic (a - 50°C, b - 100°C).



**Figura 4.8.** Spectrele ATR-FTIR ale extractului de cătină după tratament termic (a - 50°C, b - 100°C)

Spectrul IR al extractului de cătină este complex. Peak-urile caracteristice includ eteri și lactone (880  $\text{cm}^{-1}$ , 1045  $\text{cm}^{-1}$ , 1087  $\text{cm}^{-1}$ , 2880  $\text{cm}^{-1}$ ), legăturile de H, O-H și N-H se întind (3320  $\text{cm}^{-1}$ ), fenolii (1274  $\text{cm}^{-1}$ ), C = O din esteri, acizi dicarboxilici și  $\alpha$ -aminoacizi (1745  $\text{cm}^{-1}$ ), C-H și  $\text{CH}_2$  întind și deformează vibrația (1454  $\text{cm}^{-1}$ , 2880  $\text{cm}^{-1}$ ) (Stuart și al., 2009).

Probele au prezentat, în general, o mare stabilitate termică. Încalzite la 50°C, peak-urile au scăzut și au prezentat o ușoară creștere la 1160  $\text{cm}^{-1}$ , putând fi atribuite grupului de vibrație C-O (Trif și al., 2001). O bandă slabă a fost înregistrată în regiunea amprentelor probelor încălzite la 60-100°C, la 1419  $\text{cm}^{-1}$ , prezentând o creștere odată cu creșterea temperaturii. Tautomerismul ceto-enolic ar putea fi observat cu reducerea semnificativă a peak-ului carbonil (1745  $\text{cm}^{-1}$ ) la 70 și 80°C. Această bandă caracteristică apare și la probele expuse la temperatură înaltă (90 și 100°C), în timp ce formarea ceto ar putea fi favorizată de temperaturi ridicate (Laurella și al., 2013). Un alt efect al tratamentului termic a fost observat în îngustarea și scăderea benzii de 3320  $\text{cm}^{-1}$ , probabil din cauza rupturii legaturii de hidrogen. Nu s-a putut observa oxidarea acidului ascorbic la temperaturi joase, deoarece spectrul este complex (Munyaka și al., 2010).

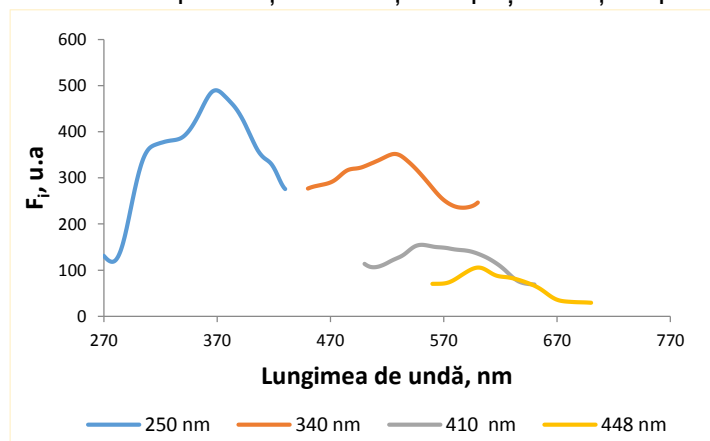
#### 4.2.3. Evaluarea modificărilor structurale ale compușilor bioactivi din extractul din *H. rhamnoides* induse de tratamentul termic

Pentru evaluarea stabilității extractului din cătină s-au folosit 0,1 mL extract (etanol:n-hexan, 4:3, v/v) diluat în 2,5 mL soluție tampon fosfat 0,01 M cu pH= 4,0.

Spectrele de emisie pentru compușii bioactivi din cătină s-au obținut la lungimile de undă 250 nm, 340 nm, 410 nm și 448 nm cu lungimi de undă la emisie diferite semnificativ. În figura 4.9. se



poate observa că spectrele obținute la aceste lungimi de undă de excitație sunt bine definite, ceea ce indică faptul că în extract sunt prezenți mai mulți compuși diferiți ce prezintă fluorescență.



**Figura 4.9.** Spectrele de fluorescență ale compușilor bioactivi din extractul de cătină netratat termic la diferite lungimi de undă de excitație

Conform [Zandomeneghi și al. \(2005\)](#) polifenolii absorb la lungimea de undă 260-310 nm și emit în intervalul 310-370 nm, compușii din grupul vitaminei E absorb la lungimea de undă 365 nm și emit la 525 nm ([Kyriakidis și al., 2000](#)). [Baran și al. \(2011\)](#) a evaluat spectrele de emisie/excitație ale quercitinei la două lungimi de undă de excitație: 380 nm și 440 nm cu un maxim al lungimii de undă de emisie  $\approx$ 540 nm.

[Pawlak și al. \(2013\)](#) au raportat că  $\beta$ -caroten-ul sub formă de monomer a prezentat maximul de intensitate la 525 nm, sub formă de cristal și agregate au arătat emisia maximă la 564 nm și 608 nm atunci când s-a excitat la lungimea de undă 413 nm. Prin urmare, se poate aprecia, pe baza profilului spectral, că extractul de cătină este deosebit de complex din punct de vedere compozițional, fiind identificați atât polifenoli, cât și carotenoizi, compuși din grupul vitaminei E și quercitinei etc.

#### 4.2.4. Studii de degradare termică a compușilor bioactivi din extractele de cătină (*H. rhamnoides*)

Cunoașterea cineticii procesului de degradare este esențială pentru previzionarea modificărilor ce pot apărea și în timpul procesării termice a produselor alimentare ce conțin acești pigmenți naturali ([Avila și al., 1999](#)). [Patras și al. \(2010\)](#) au subliniat importanța înțelegerii cineticii procesului de degradare, a ordinului de reacție, constantele vitezelor de degradare și energia de activare. Acestea pot avea un impact pozitiv în ceea ce privește previzionarea pierderilor în calitatea alimentelor în timpul tratamentelor termice.

Aceste studii de cinetică au fost realizate pentru conținutul de carotenoizi totali, polifenoli, flavonoide din extractul de cătină, dar și pentru activitatea antioxidantă, în intervalul de temperatură 60-100°C.

##### 4.2.4.1. Conținutul de carotenoizi totali

Modelul cinetic de conversie fracțională a fost utilizat pentru descrierea degradării termice a conținutului de carotenoizi totali din extractul de cătină.

Conform modelului cinetic modelat prin conversie fracțională, viteza de degradare a compușilor carotenoidici crește constant de la  $17,83 \pm 2,85 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  la  $60^\circ\text{C}$  până la  $24,02 \pm 3,67 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  la  $100^\circ\text{C}$  (tabelul 4.6.).

**Tabelul 4.6.** Parametrii cinetici care descriu degradarea conținutului de carotenoizi totali din extractul de cătină conform modelului cinetic de conversie fracțională

Temperatura, °C	$k \cdot 10^{-2} (\text{min}^{-1})$	R <sup>2</sup>
60	$17,83 \pm 2,85^a$	0,978
70	$18,83 \pm 2,78$	0,985
80	$21,42 \pm 3,18$	0,976
90	$23,47 \pm 4,48$	0,969
100	$24,02 \pm 3,67$	0,978
$E_a (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	<b><math>8,45 \pm 0,93</math></b>	<b>0,964</b>

Fратиани și al., (2010) au raportat un model cinetic de ordinul I pentru degradarea termică a conținutul de  $\beta$ -caroten din suc de portocale procesat cu microunde la  $60^\circ\text{C}$ , cu valori ale constantelor de degradare ( $k$ ) de  $2,30 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ , respectiv  $65,80 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  la  $75^\circ\text{C}$ . Aparicio-Ruiz și al. (2011) au demonstrat că modelul cinetic de ordinul I este adecvat pentru a descrie degradarea termică a  $\beta$ -carotenului,  $\beta$ -criptoxantinei și luteinei din uleiurile virgine de măsline, indicând valori ale lui  $k$  cuprinse între  $17,16 \pm 0,33 \text{ min}^{-1}$  la  $60^\circ\text{C}$  până la  $188,66 \pm 5,66 \text{ min}^{-1}$  la  $100^\circ\text{C}$  pentru degradarea  $\beta$ -carotenului.

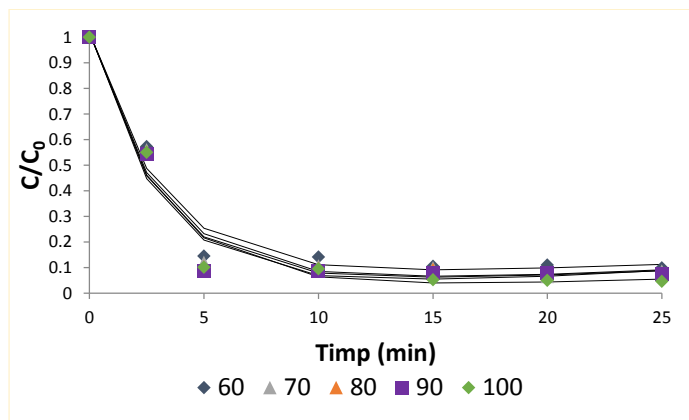
Termostabilitatea carotenoizilor se datorează dublelor legături conjugate. Când se aplică un tratament termic de severitate ridicată, structurile sunt scindate și apar reacții moleculare în care sunt implicate dublele legături. Ty și al. (1999) au afirmat că se formează două tipuri de produse în urma degradării termice: o fracțiune volatilă cu masă moleculară mică care se volatilizează și o fracțiune nevolatilă cu fragmentele mai mari ale moleculelor ce rezultă după scindarea fracțiunii volatile a carotenului. Rios și al. (2008) au arătat că  $\beta$ -carotenul în condiții termice mai puțin severe duce la formarea de toluen, xilen și m-2,6-dimetilnaftalen.

#### 4.2.4.2. Conținutul de polifenoli totali

Degradarea termică a polifenolilor totali din extractul de cătină a urmat un model cinetic de conversie fracțională.

În figura 4.18. sunt prezentate curbele de degradare ale compușilor polifenolici din extractul de cătină supus tratamentului termic la temperaturi între  $60$ - $100^\circ\text{C}$ . Se poate observa o degradare rapidă a acestora până la minutul 5 de menținere la temperatura constantă.





**Figura 4.18.** Degradarea termică a compușilor polifenolici din extractului cătină conform modelului cinetic de conversie fracțională

Conform modelului cinetic de conversie fracțională,  $k$  a variat de la  $31,27 \pm 3,46 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  la  $34,27 \pm 6,19 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ , ca urmare a creșterii temperaturii de la 60 la 100°C (tabelul 4.7.).

**Tabelul 4.7.** Parametrii cinetici pentru conținutul de polifenoli totali din extractele de cătină conform modelului cinetic de conversie fracțională

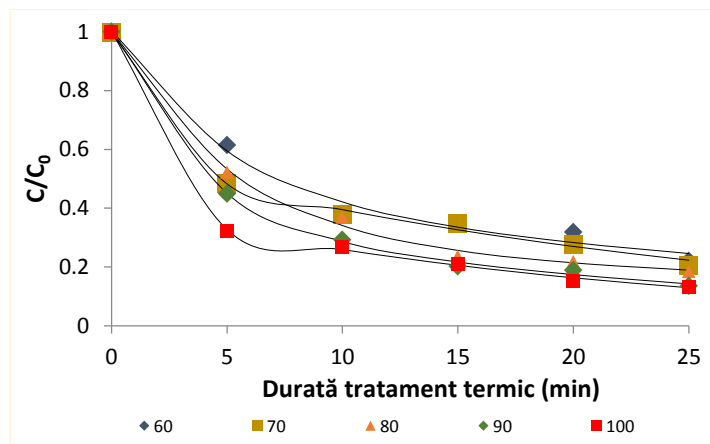
Temperatura, °C	$k \cdot 10^{-2} (\text{min}^{-1})$	$R^2$
60	$31,27 \pm 3,46$	0,989
70	$31,40 \pm 3,43$	0,989
80	$31,51 \pm 3,17$	0,990
90	$33,42 \pm 4,18$	0,986
100	$34,27 \pm 6,19$	0,985
$E_a (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$2,50 \pm 0,66$	<b>0,827</b>

În literatura de specialitate s-au raportat modele cinetice de ordinul I pentru degradarea compușilor polifenolici. Astfel, [Jaiswal și al. \(2012\)](#) au obținut în urma aplicării tratamentului de blanșare la varză, valori ale  $k$  de  $37,90 \pm 0,00 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  la 80°C și  $k$  de  $48,40 \pm 4,00 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  la 100°C, iar energia de activare raportată a fost de  $11,54 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . [Turturică și al. \(2016\)](#) au sugerat tot un model de ordinul I pentru degradarea termică a compușilor polifenolici din extractul de prune, unde au obținut valori pentru constantele de degradare de  $0,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  la 70°C și de  $2,90 \pm 0,7 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  la 110°C, iar  $E_a$   $36,00 \pm 8,0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

[Zorić și al. \(2014\)](#) folosind modelul cinetic de ordinul I, au obținut prin creșterea temperaturii de la 80 la 120°C a soluției de quercetin-3-glucozid din pasta de cireșe, valori ale constantei de degradare ce au variat de la  $1,5$  la  $2,6 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ .

#### 4.2.4.3. Conținutul de flavonoide totale

În figura 4.20. sunt prezentate curbele de degradare a compușilor flavonoidici din extractul de cătină supus tratamentului termic la temperaturi între 60-100°C. Și în acest caz se poate observa o degradare rapidă a compușilor în primele 5 minute de menținere la temperatură constantă.



**Figura 4.20.** Degradarea termică a flavonoidelor din extractul de cătină descrisă printr-un model cinetic fracțional

Conform modelului cinetic modelat prin conversie fracțională, vitezele constantelor de degradare a conținutului total de flavonoide a crescut de la  $14,13 \pm 1,89 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  la  $60^\circ\text{C}$  până la  $38,47 \pm 13,30 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  la  $100^\circ\text{C}$  (tabelul 4.8.).

**Tabelul 4.8.** Parametrii cinetici obținuți pentru conținutul de flavonoide totale din extractele de cătină conform modelului cinetic de conversie fracțională

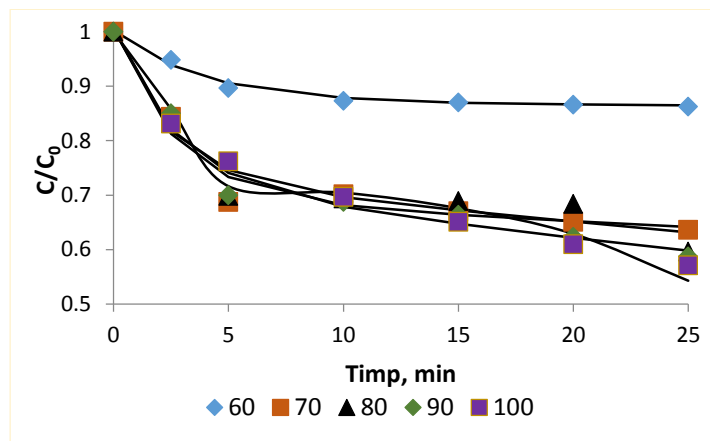
Temperatura, °C	$k \cdot 10^{-2} (\text{min}^{-1})$	$R^2$
60	$14,13 \pm 1,89$	0,988
70	$15,47 \pm 3,01$	0,979
80	$18,32 \pm 1,56$	0,992
90	$19,04 \pm 1,57$	0,993
100	$38,47 \pm 13,30$	0,983
$E_a (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$22,50 \pm 7,26$	0,761

Și pentru conținutul de flavonoide s-a raportat în literatura de specialitate tot modelul de ordinul I, astfel [Jaiswal și al. \(2013\)](#) au afirmat că energia de activare în cazul compușilor flavonoidici a fost de  $9,22 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , iar [Turturică și al. \(2016\)](#) au raportat o valoare a  $E_a = 18,00 \pm 2,0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

#### 4.2.4.4. Activitatea antioxidantă

Pentru descrierea degradării termice a activității antioxidante a fost utilizat modelul cinetic de conversie fracțională.

Efectul tratamentului termic asupra activității antioxidante este redat în figura 4.22., unde sunt prezentate curbele de degradare.



**Figura 4.22.** Degradarea termică a activității antioxidante din extractului de cătină descrisă printr-un model cinetic fracțional

Din figura 4.22. se poate observa că la temperatura de 60°C are loc o degradare mai lentă comparativ cu temperaturile mai ridicate care induc o scădere a activității antioxidante. Conform modelului cinetic modelat prin conversie fracționată, viteza de degradare a activității antioxidante (DPPH RSA) a crescut de la  $16,30 \pm 3,09 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  la 60°C până la  $30,52 \pm 6,40 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  la 100°C (tabelul 4.9.).

**Tabelul 4.9.** Parametrii cinetici estimați și energia de activare a activității antioxidante din extractul de cătină

Temperatura, °C	$k \cdot 10^2 (\text{min}^{-1})$	$R^2$
<b>60</b>	$16,30 \pm 3,09$	0,989
<b>70</b>	$23,18 \pm 7,26$	0,979
<b>80</b>	$24,21 \pm 9,37$	0,932
<b>90</b>	$28,53 \pm 5,84$	0,961
<b>100</b>	$30,52 \pm 6,40$	0,928
<b><math>E_a (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})</math></b>	<b><math>15,22 \pm 2,75</math></b>	<b>0,910</b>

Având în vedere valorile constantelor vitezei de degradare, se poate afirma că în cazul conținutului total de polifenoli are loc o degradare mai rapidă, comparativ cu celelalți compuși.

### 4.3. Concluzii parțiale

Acest studiu a urmărit extracția, caracterizarea fitochimică și evaluarea modificărilor structurale induse de tratamentul termic asupra compușilor bioactivi din extractele de *H. rhamnoides*.

În urma analizei HPLC s-au identificat în extractul de cătină 12 compuși: astaxantina, zeaxantina, zeaxantina-palmitat,  $\gamma$ -caroten, cis  $\beta$ -caroten,  $\beta$ -criptoxantina, licopen, luteină-palmitat-miristat, luteină di-palmitat,  $\beta$ -caroten,  $\alpha$ -caroten, și zeaxantină di-palmitat. Din punct de vedere cantitativ, extractul s-a caracterizat printr-un TCC de  $38,34 \pm 5,71 \text{ mg/g s.u.}$ , TPC de

140,14 ± 6,64 mg AG/g s.u. și TFC de 5,04 ± 0,05 mg EC/g s.u., iar activitatea antioxidantă 33,7 ± 0,29%, corespunzând la 2,50 ± 0,02 μM Trolox/g s.u.

Influența tratamentului termic a fost utilizată pentru a descrie cantitativ impactul prelucrării asupra conținutului de compuși bioactivi din extractul de cătină. Complexitatea structurală a extractului de cătină a fost evidențiată prin tehnici de fluorescență și spectroscopie FT-IR. Patru clase majore de compuși au fost identificate după cum urmează: fenoli, flavonoide, tocoferoli și carotenoide. Spectrul IR a evidențiat, de asemenea, complexitatea extractului din cătină, care implică peak-uri caracteristice pentru eteri și lactone, legăturile H-OH și întinderea NH, fenoli, C = O în esteri, acizi dicarboxilici și α-aminoacizi, vibrații de întindere și deformare a C-H și CH<sub>2</sub>. Tratamentul termic a provocat modificări ale lungimilor de undă maxime la emisie, indicând caracterul secvențial al modificărilor structurale ale compușilor fitochimici, în timp ce ATR-ul probelor a relevat o stabilitate termică, în general, ridicată.

Degradarea cinetică a conținutului fitochimic din extractul de cătină tratat termic a fost modelat cu ajutorul modelului prin conversie fracțională. Variația constantelor vitezei de degradare cu temperatura a fost descrisă de relația Arrhenius. Valorile calculate ale energiei de activare pentru diferite conținuturi fitochimice au evidențiat faptul că polifenolii și, respectiv, carotenoizii sunt stabili la tratament termic, în timp ce flavonoidele și activitatea antioxidantă prezintă o stabilitate termică scăzută.

Acest studiu oferă informații importante privind cinetica degradării fitochimice, care va facilita optimizarea tratamentului termic în industria alimentară în ceea ce privește siguranța alimentară și valoarea nutrițională.

## 5. Studii avansate de evaluare a mecanismelor de legare dintre compușii carotenoidici din extractul de cătină și proteinele zerului

### 5.1. Evaluarea mecanismului de legare dintre $\alpha$ -lactalbumina și compușii carotenoidici din extractul de cătină și evaluarea stabilității complexului în diferite condiții de mediu

#### 5.1.1. Introducere

Obiectivele studiului au constat în investigarea mecanismelor de legare dintre principalele proteine din zer ( $\beta$ -LG și  $\alpha$ -LA) și carotenoizii din extractele de cătină, precum și evaluarea stabilității complexelor formate în diferite condiții de pH și tratament termic, din perspectiva dezvoltării unor compozite cu funcționalitate ridicată pentru utilizare în produsele alimentare și/sau suplimente.

Metodele de investigare au utilizat experimente de quenching, spectroscopie UV-vis și tehnici *in silico*.

Pentru aceste experimente s-au utilizat soluții proteice de  $\alpha$ -LA fără ioni de Ca și respectiv  $\beta$ -LG,  $\beta$ -caroten, ANS (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). Fructele de cătină albă au fost achiziționate, așa cum s-a specificat anterior, din Galați, fiind ulterior liofilizate. Toți reactivii utilizați au avut puritate analitică.

#### 5. 1. 2. Rezultate și discuții

##### 5.1.2.1. Studiul capacității $\alpha$ -LA de a lega carotenoizi în sisteme model

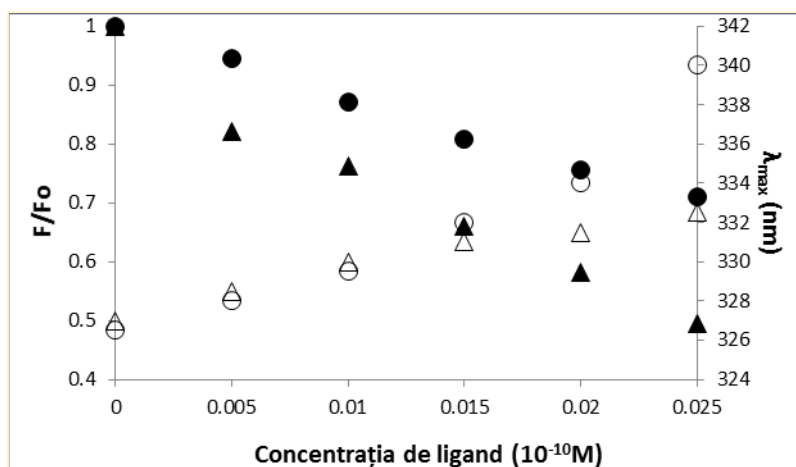
- **Mecanismul de legare a carotenoizilor din extractul de cătină (EC) la  $\alpha$ -LA**

Interacțiunea dintre  $\alpha$ -LA și EC a fost examinată prin investigarea influenței creșterii concentrației de EC asupra fluorescenței proteinei tratată termic în intervalul de temperatură 25°C-100°C. Deoarece conținutul de carotenoizi totali din extract se exprimă în  $\beta$ -caroten, au fost efectuate experimente similare în sistem model utilizând o soluție de  $\beta$ -caroten.

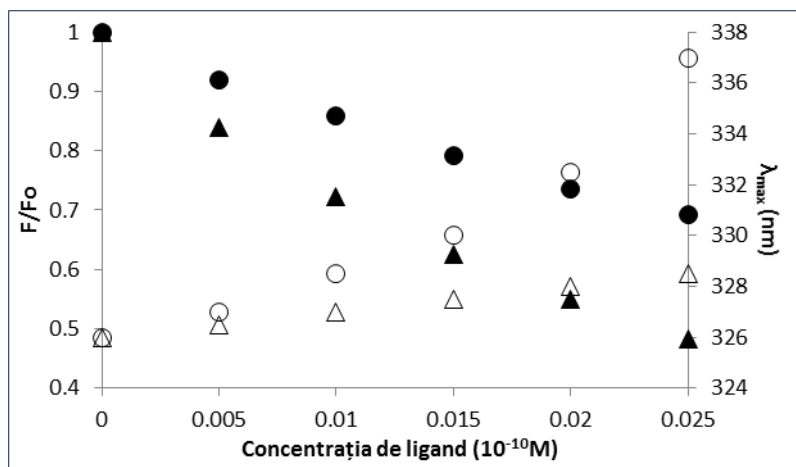
Pentru evaluarea gradului de expunere a resturilor de Trp se ia în considerare valoarea lungimii de undă la care se înregistrează maximul intensității fluorescenței ( $\lambda_{max}$ ). Dacă valoarea  $\lambda_{max}$  este mai mică de 330 nm atunci resturile de Trp sunt blocate într-un mediu nepolar, iar în cazul în care  $\lambda_{max}$  este mai mare de 330 nm, resturile de Trp sunt expuse la solvent într-un mediu polar (Vivian și al., 2001). Valorile  $\lambda_{max}$  ale  $\alpha$ -LA în absența ligandului au înregistrat un red-shift de la 326 nm la 25°C nm până la 329 nm la 100°C, indicându-se faptul că la temperaturi mai mari de 80°C proteina începe să-și piardă structura compactă a subdomeniului hidrofob unde sunt plasate resturile de Trp. Cu alte cuvinte, red-shift-ul este un indicator al modificărilor micromediului resturilor de Trp din  $\alpha$ -LA, evidențiind creșterea hidrofobității în vecinătatea acestora. Același model a fost observat la adăugarea ligandului în soluția de proteină, indicând interacțiuni hidrofobe între ligand și  $\alpha$ -LA. Modificările fluorescenței restului de Trp din  $\alpha$ -LA induse

de liganzi hidrofobi pot produce transfer de energie între inelul indol excitat (Trp) și liganzi, dar și modificări ale polarității micromediului restului de Trp sau ambele efecte (Mensi și al., 2013).

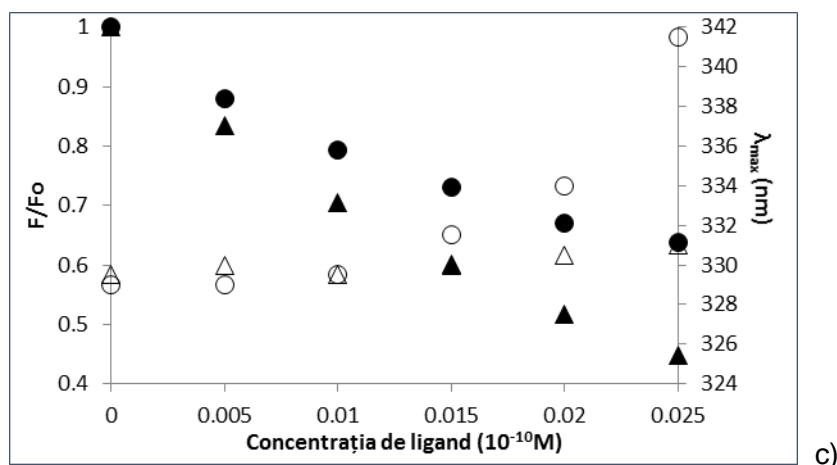
În figura 5.3 este reprezentat raportul dintre  $F$  și  $F_0$  a două sisteme bazate pe  $\alpha$ -LA tratată la diferite temperaturi (25°C, 60°C și 90°C). Se poate observa că  $\beta$ -carotenul a determinat o stingere mai rapidă a fluorescenței resturilor de Trp din  $\alpha$ -LA, comparativ cu EC.  $\beta$ -Carotenul la concentrație maximă a indus o scădere a fluorescenței de 50,4% din  $\alpha$ -LA nativă, în timp ce EC a stins doar 29% din fluorescența inițială a proteinei. Gradul maxim de quenching a fost atins la 100°C, unde  $\beta$ -carotenul și EC au determinat stingerea fluorescenței resturilor de Trp cu 56% și respectiv cu 47%.



a)



b)



**Figura 5.3.** Modificările structurale ale  $\alpha$ -LA tratată termic la 25°C (a), 60°C (b) și 90°C (c) cu EC (cerc) și  $\beta$ -caroten (triunghi) monitorizate ca raport  $F/F_0$  (● și ▲) și lungimea de undă de emisie maximă (○ și Δ)

Adăugarea a 50  $\mu$ L de EC în soluția de  $\alpha$ -LA nativă (figura 5.3 a) a produs un red-shift de 13 nm, în timp ce în cazul  $\beta$ -carotenului, adăugarea a indus un red-shift de 6 nm. În intervalul de temperatură de la 50°C la 90°C (figura 5.3 b și c),  $\lambda_{max}$  a variat de la 326 nm la 329 nm în cazul utilizării  $\beta$ -carotenului. În cazul experimentelor de quenching cu EC, tratamentul termic la temperaturi între 70°C și 80°C a indus variații ale  $\lambda_{max}$  de la 326 nm până la 334 nm, iar tratamentul termic mai sever a determinat un red-shift de 11 nm.

Un comportament similar a fost raportat de [Mensi și al., \(2013\)](#) pentru interacțiunea  $\beta$ -lactoglobulinei cu carotenoizi, cum ar fi  $\beta$ -carotenul,  $\beta$ -criptoxantina și  $\alpha$ -carotenul. Autorii au constatat că, în ciuda hidrofobicității sale ridicate,  $\beta$ -carotenul posedă o afinitate pentru  $\beta$ -LG. Conform polarității, carotenoidele pot fi grupate în caroteni și xantofile ([Victoria-Campos și al., 2013](#)). Având în vedere că EC conține atât caroteni cât și xantofile, se poate presupune că în cazul experimentelor de quenching cu EC, există o competiție în ceea ce privește legarea la situsurile de legare ale proteinei între compușii carotenoidici din complex. O analiză detaliată la nivel atomic efectuată de [Mohammadi și Moeeni \(2015\)](#) a  $\alpha$ -LA la diferite temperaturi a indicat că: Trp<sup>118</sup> este cel mai expus, fiind situat la suprafața  $\alpha$ -LA, Trp<sup>26</sup> este blocat în matricea proteinei, fiind situat într-o regiune hidrofobă, iar Trp<sup>104</sup> este parțial protejat de solvent, în timp ce Trp<sup>60</sup> este blocat aproape în întregime. Prin urmare, se poate presupune că aceste resturi de Trp trec la mediul mai polar având o contribuție majoră la procesul de legare de EC.

#### ▪ Constanta de legare și numărul de situsuri de legare

Una dintre cele mai importante abordări în elucidarea mecanismelor de legare a moleculelor mici la proteine este efectuarea experimentelor de quenching ([Mohammadi și al., 2015](#)), care permit estimarea parametrilor de legare.

Pentru a elucidă mecanismul de quenching al  $\alpha$ -LA cu EC și  $\beta$ -caroten, datele au fost analizate cu ajutorul ecuației Stern-Volmer, conform [Dumitrașcu și al. \(2015\)](#), iar constantele Stern Volmer ( $K_{SV}$ ) au fost calculate în urma interacțiunii dintre  $\alpha$ -LA-EC și  $\alpha$ -LA- $\beta$ -caroten. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 5.1 (a și b).

**Tabel 5.1.** Parametrii de legare ai  $\alpha$ -LA cu EC (a) și  $\beta$ -caroten (b)

a)

T(°C)	$K_{SV}(10^{-11} \text{ L/mol})$	$R^b$	$K_b(10^{-11} \text{ L/mol})$	$n$	$R^c$
25	1,69±0,02 <sup>a</sup>	0,998	1,60±0,27	1,55±0,13	0,990
50	1,54±0,12	0,997	1,04±0,08	1,13±0,07	0,995
60	1,57±0,02	0,996	1,05±0,19	1,09±0,12	0,998
70	1,91±0,02	0,999	1,02±0,02	1,13±0,05	0,999
80	1,95±0,16	0,999	0,88±0,08	1,02±0,007	0,999
90	1,67±0,07	0,998	0,70±0,08	0,93±0,008	0,998
100	2,29±0,12	0,994	0,99±0,03	0,93±0,02	0,998

b)

T(°C)	$K_{SV}(10^{-6} \text{ L/mol})$	$R^b$	$K_b(10^{-11} \text{ L/mol})$	$n$	$R^c$
25	3,86±0,16 <sup>a</sup>	0,997	1,57±0,12	1,13±0,06	0,999
50	4,28±0,07	0,995	1,48±0,03	1,14±0,01	0,999
60	4,25±0,06	0,997	1,43±0,03	1,06±0,01	0,999
70	3,83±0,27	0,996	1,40±0,01	1,10±0,006	0,999
80	4,83±0,15	0,993	1,68±0,06	1,19±0,01	0,999
90	4,6±0,07	0,995	1,55±0,05	1,07±0,002	0,998
100	4,91±0,02	0,994	1,40±0,003	1,13±0,002	0,999

<sup>a</sup> deviația standard

$R^b$  coeficientul de corelație pentru valorile  $K_{SV}$

$R^c$  coeficientul de corelație pentru valorile  $K_b$

Valorile  $K_{SV}$  au prezentat valori mai mici atunci când s-au efectuat experimentele de quenching cu soluție de  $\beta$ -caroten, indiferent de temperatura aplicată. La experimentele de quenching cu EC, cea mai mică valoare  $K_{SV}$  a fost calculată pentru temperatura de 50°C ( $1,54 \pm 0,12 \cdot 10^{-11} \text{ L/mol}$ ) și cea mai ridicată la 100°C ( $2,29 \pm 0,12 \cdot 10^{-11} \text{ L/mol}$ ), ceea ce sugerează că gradul de expunere a resturilor de Trp la EC este mai mare la temperaturi mai ridicate. Pe de altă parte, în cazul experimentelor de quenching cu  $\beta$ -caroten, valorile  $K_{SV}$  au crescut la temperaturi cuprinse între 25°C și 60°C de la  $3,86 \pm 0,16 \cdot 10^{-11} \text{ L/mol}$  până la  $4,25 \pm 0,06 \cdot 10^{-11} \text{ L/mol}$ , în timp ce încălzirea la 70°C a  $\alpha$ -LA a generat un grad similar de expunere a Trp ca la 25°C. Valoarea maximă  $K_{SV}$  pentru experimentele de quenching cu  $\beta$ -caroten a fost atinsă la 100°C ( $4,91 \pm 0,02 \cdot 10^{-11} \text{ L/mol}$ ), la fel ca în cazul experimentelor de quenching cu EC. Creșterea constantelor de quenching la temperaturi mai ridicate sugerează modificarea structurii terțiare a  $\alpha$ -LA, în care resturile de Trp sunt mai expuse la agentul de quenching. În ceea ce privește influența tratamentului termic asupra flexibilității moleculare, se poate observa că titrarea cu EC a condus la o structură terțiară mai flexibilă a  $\alpha$ -LA, comparativ cu experimentele în care  $\beta$ -carotenul a fost utilizat ca agent de quenching.

Valorile pentru numărul locurilor de legare ( $n$ ) calculate pentru complexul  $\alpha$ -LA-EC (tabelul 5.1 a) au scăzut odată cu creșterea temperaturii de la  $1,55 \pm 0,13$  la  $0,93 \pm 0,02$ , indicând faptul că afinitatea  $\alpha$ -LA pentru EC scade odată cu creșterea temperaturii tratamentului termic aplicat proteinei. În cazul  $\beta$ -carotenului (tabelul 5.1 b), valorile  $n$  sunt apropiate între ele pentru întreg

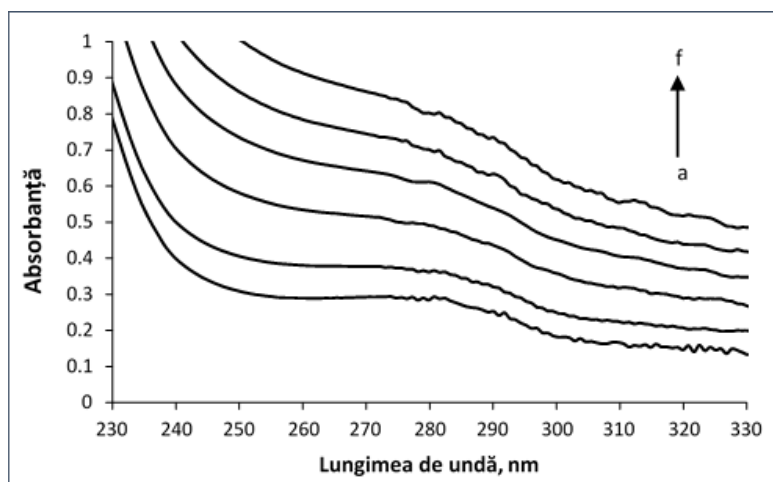


intervalul de temperatură, ceea ce duce la ipoteza că, indiferent de tratamentul termic aplicat, molecula de  $\alpha$ -LA are cel puțin un situs de legare cu afinitate mare pentru  $\beta$ -caroten.

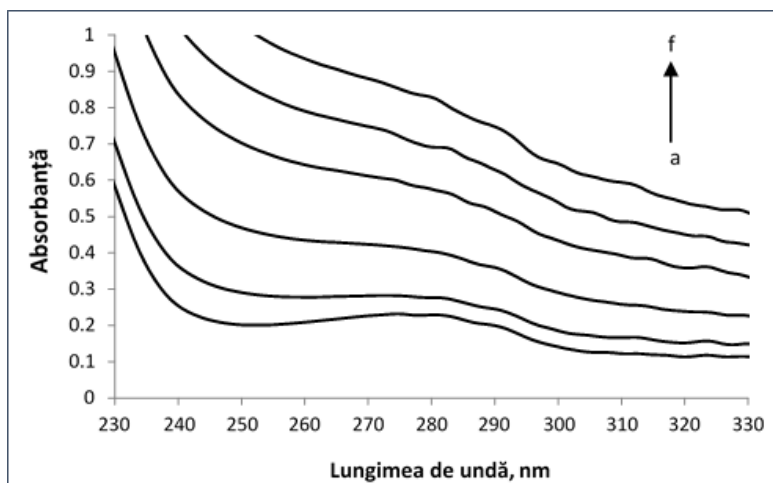
#### ▪ Analiza spectrelor de absorbție UV-vis

Spectroscopia de absorbție UV-vis reprezintă una dintre tehnicile cele mai utilizate pentru studiul modificărilor conformaționale ale proteinelor, care poate fi utilizată cu succes în evaluarea formării unor complexe cu diverși liganzi. Spectrul de absorbție se modifică odată cu modificarea structurii proteinei, care poate fi observată ca un peak sau ca o creștere/scădere a intensității absorbției (Song și al., 2015). Astfel, se pot obține informații referitoare la natura interacțiunii dintre  $\alpha$ -LA și EC, spectrele de absorbție UV-vis ale  $\alpha$ -LA, cu și fără EC sau  $\beta$ -caroten.

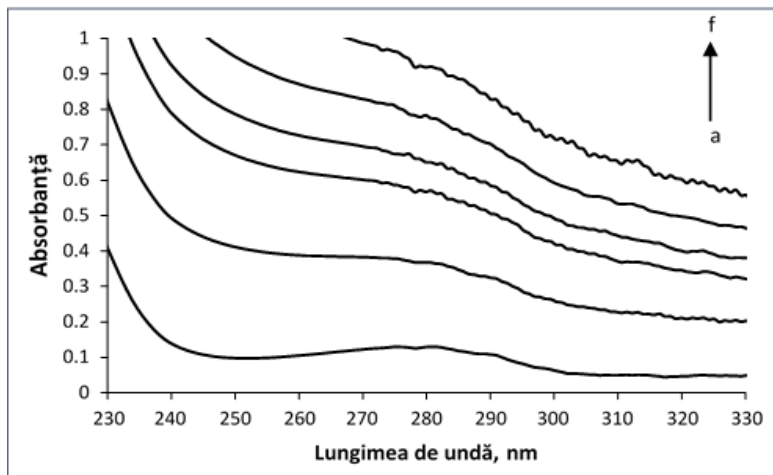
În figura 5.4 sunt redate spectrele UV-vis ale  $\alpha$ -LA tratată termic în absența/prezența extractului EC cu diferite concentrații (a-f corespunde concentrațiilor de la 0,005 – 0,025 · 10<sup>-10</sup> M).



a)



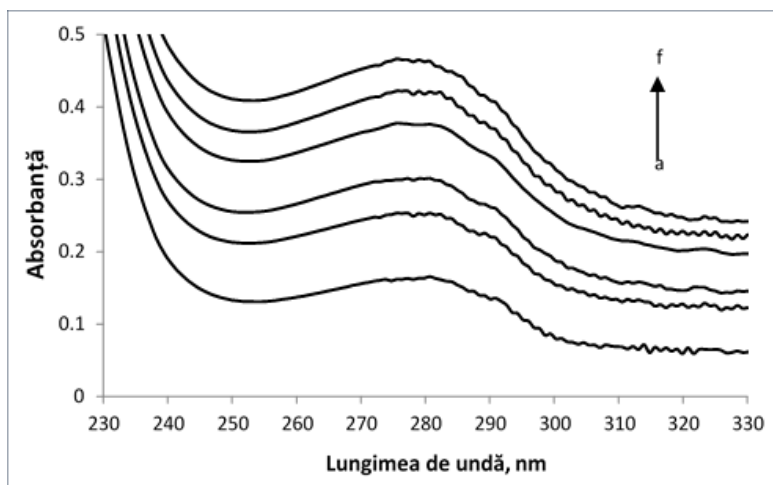
b)



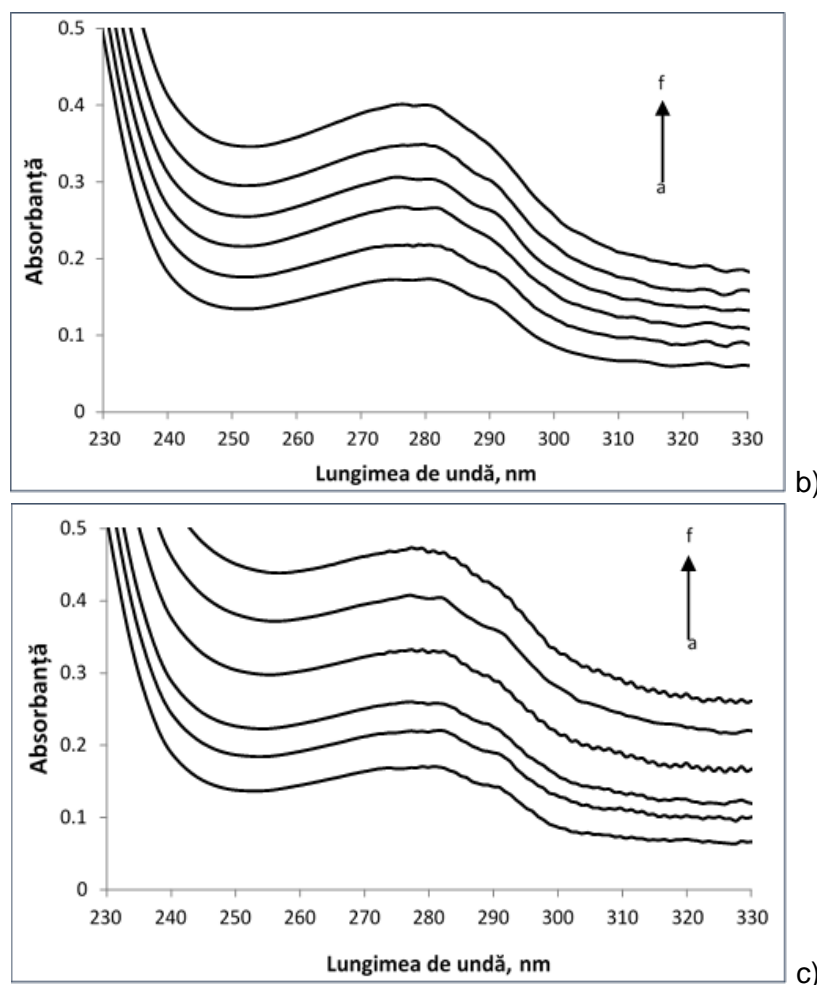
c)

**Figura 5.4.** Spectrele de absorbție UV–vis ale  $\alpha$ -LA tratată termic la 25°C (a), 60°C (b) and 90°C (c) prezența diferitelor concentrații de EC (a-f corespunde concentrațiilor de la 0,005 – 0,025·10<sup>-10</sup> M)

În figura 5.5 sunt redată spectrele UV–vis ale soluției de  $\alpha$ -LA tratată termic în absența și prezența  $\beta$ -carotenului cu diferite concentrații (a-f corespunde concentrațiilor de la 0,005 – 0,025·10<sup>-10</sup> M).



a)



**Figura 5.5.** Spectrele UV–vis ale  $\alpha$ -LA tratată termic la 25°C (a), 60°C (b) and 90°C (c) în prezența diferitelor concentrații de  $\beta$ -caroten (a-f corespunde concentrațiilor de la 0,005 – 0,025·10<sup>-10</sup> M)

Din figurile 5.4 și 5.5 se poate vedea că  $\alpha$ -LA nativă prezintă un singur peak de absorbție la 280 nm, evidențiind astfel natura cromoforilor micromediului (Trp, Tyr și Phe). De asemenea, se poate observa că intensitatea spectrelor de absorbție rezultate în urma interacțiunii  $\alpha$ -LA cu EC sunt mai mari decât cele obținute cu  $\beta$ -caroten. De asemenea, se poate observa, în toate cazurile, că intensitatea spectrelor de absorbție ale  $\alpha$ -LA crește odată cu creșterea concentrației de ligand adăugată.

Creșterea concentrației EC a dus la scăderea maximului de absorbție la aproximativ 280 nm (figura 5.4). În intervalul de temperatură de 25-80°C, nu au fost observate modificări semnificative ale peak-ului ce caracterizează complexul  $\alpha$ -LA- $\beta$ -caroten, iar la temperaturi mai ridicate s-a înregistrat un blue-shift de la 280 nm până la 276 nm (figura 5.5). Aceste rezultate evidențiază faptul că modificările conformaționale ale structurii  $\alpha$ -LA au alterat micromediul resturilor cromofore, fapt care susține interacțiunea cu liganzii. Zhang și al., (2012) au studiat legarea dintre bixină și proteine din zer. S-a constatat că adăugarea bixinei a dus la un blue-shift de 7 nm în

spectrele de absorbție ale  $\alpha$ -LA, indicând faptul că unele resturi de Trp sunt blocate în proteina globulară.

Barbana și *al.*, (2011) au sugerat că la temperaturi de peste 80°C,  $\alpha$ -LA a prezentat o scădere a accesibilității agentului de quenching însoțită de un blue-shift. Acest lucru evidențiază faptul că are loc o interacțiune între resturile de Trp și faza apolară a bistratului lipidic. Având în vedere faptul că această coliziune nu a schimbat spectrul UV-vis al proteinei, se poate concluziona faptul că spectrele de absorbție obținute după legare indică formarea complexului (Zhang și *al.*, 2012).

#### 5.1.1.1. Studiul influenței tratamentului termic asupra stabilității complexului format între $\alpha$ -LA și carotenoizii din extractul de cătină

##### ▪ Diagrama de faze

Această metodă a fost utilizată în acest studiu pentru a analiza mecanismul de depliere/pliere/repliere a complexului  $\alpha$ -LA-EC, prin identificarea unor stări intermediare apărute în urma tratamentului termic.

În figura 5.7. se poate observa că tratamentul termic a indus modificări structurale semnificative în complexul  $\alpha$ -LA-EC, corelația neliniară subliniind caracterul secvențial al transformărilor structurale, care implică pliarea și deplierea lanțurilor polipeptidice odată cu creșterea temperaturii.

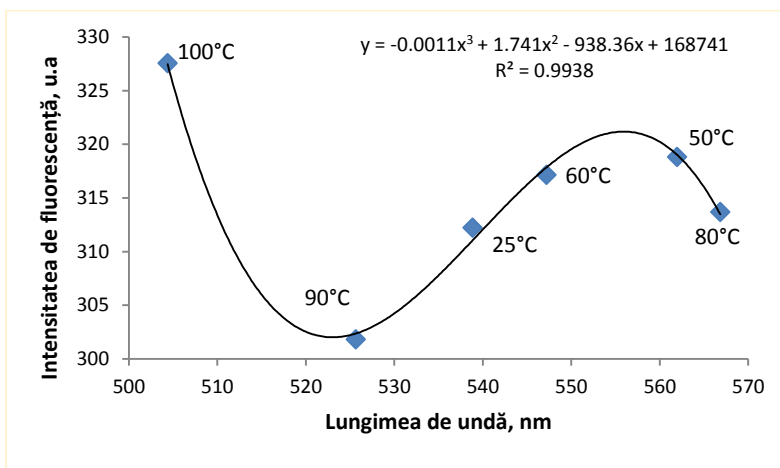
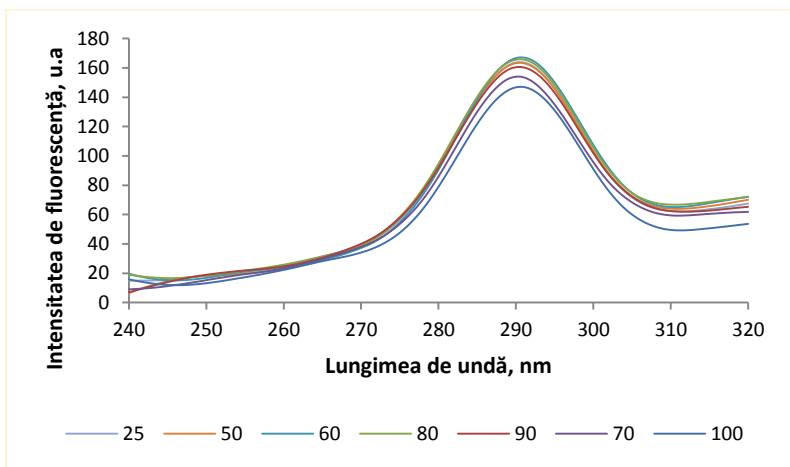


Figura 5.7. Diagrama de faze complex  $\alpha$ -LA-EC, obținută în urma tratamentului termic

##### ▪ Spectre sincron

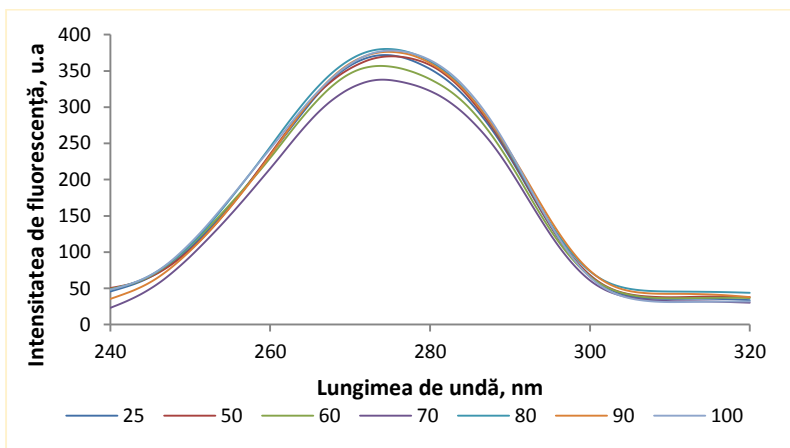
Spectrele sincron ale complexului  $\alpha$ -LA-EC au fost înregistrate la  $\Delta\lambda=60$  nm care descriu proprietățile conformaționale ale resturilor de Trp și respectiv la  $\Delta\lambda=15$  nm pentru resturile de Tyr (Liang-liang Shen și *al.*, 2014).

În figura 5.9. sunt redată spectrele sincron obținute la  $\Delta\lambda=15$  nm. Se poate remarca faptul că cea mai mică valoare a intensității fluorescenței s-a înregistrat la 100°C, fiind cu aproximativ 10% mai mică față de cea obținută la 25°C. Tratamentul termic nu a avut o influență semnificativă asupra lungimii de undă la care s-a obținut maximum intensității de fluorescență, ceea ce denotă că natura mediului adiacent resturilor de Tyr nu se modifică la tratamentul termic.



**Figura 5.9.** Spectre sincron ale complexului α-LA - EC la  $\Delta\lambda=15$  nm

În ceea ce privește spectrele obținute la  $\Delta\lambda=60$  nm (figura 5.10.), se poate observa faptul că la temperaturi mai mari de 80°C s-au obținut valori superioare ale intensității fluorescenței (la temperaturi mai mari de 80°C s-au înregistrat valori maxime). Tratamentul termic nu a indus modificări semnificative în lungimea de undă la care s-a înregistrat maximul intensității de fluorescență, acestea variind între 274,5 nm la 25°C și 275 la 100°C.



**Figura 5.10.** Spectre sincron ale complexului α-LA - EC la  $\Delta\lambda=60$  nm

Pe baza valorilor obținute pentru intensitatea fluorescență a spectrelor sincron, se poate concluziona faptul că fluorescența complexului se datorează în principal resturilor de Trp și mai puțin celor de Tyr. De asemenea, tratamentul termic în intervalul de temperatură menționat nu induce modificări semnificative sau reorientări spațiale ale resturilor hidrofobe.

#### 5.1.1.2. Parametri termodinamici pentru complexul α-LA-EC

Studiile termodinamice oferă informații necesare pentru a înțelege forțele moleculare care conduc la formarea complexului (Bujalowski și al., 2014). În tabelul 5.3. (a și b) sunt redată modificările valorilor entalpiei ( $\Delta H$ ) și a entropiei ( $\Delta S$ ), precum și modificările energiei libere Gibbs ( $\Delta G$ ).

La reprezentarea grafică a logaritmului natural al lui  $K_b$  versus  $1/T$  (K) s-a obținut o relație liniară la experimentele de legare între EC și  $\alpha$ -LA și două relații liniare în cazul experimentelor cu  $\beta$ -caroten (între 25°C și 70°C și între 80°C și 100°C). Valorile  $\Delta G$  au fost negative pentru legarea EC și pozitive în cazul legării  $\beta$ -carotenului, indicând faptul că procesul de legare a fost spontan la complexul  $\alpha$ -LA-EC, iar în cazul complexului  $\alpha$ -LA- $\beta$ -caroten legarea s-a realizat treptat. Valorile negative calculate pentru  $\Delta H$  și  $\Delta S$  sugerează că atât legăturile de hidrogen, cât și interacțiunile van der Waals joacă un rol esențial în procesul de legare a ambelor complexe. Așa cum se observă în tabelul 5.3 a, principalele surse ale valorilor  $\Delta G$  derivă din contribuția mare a factorului  $\Delta H$ , sugerând că interacțiunea hidrofobă ar putea juca un rol-cheie în interacțiunea EC cu  $\alpha$ -LA. Mai mult decât atât, valorile negative pentru  $\Delta G$  și  $\Delta H$  sugerează că procesul de formare a complexului  $\alpha$ -LA-EC a fost exoterm.

**Tabelul 5.3.** Parametri termodinamici pentru asocierea  $\alpha$ -LA tratată termic cu EC (a) și  $\beta$ -caroten (b)

a)

T(K)	$\Delta H$ (J/mol)	$\Delta S$ (J/mol/K)	$\Delta G$ (J/mol)	$R^a$
298			-3269,71±41,25	
323			-3171,21±13,5	
333	-4443,83±24,25	-3,94	-3131,81±2,16	0,95
343			-3092,41±18,96	
353			-3053,01±29,87	
363			-3013,61±25,38	
373			-2974,21±18,36	

b)

T(K)	$\Delta H$ (J/mol)	$\Delta S$ (J/mol/K)	$\Delta G$ (J/mol)	$R^a$
298			666,22±39,35	
323	-3243,54±169,54	-13,12±2,1	994,22±44,27	0,98
333			1125,42±65,24	
343			1256,62±58,3	
353			619,84±24,82	
363			914,14±54,78	
373	-9768,95±458,37	-29,43±1,33	1208,44±49,57	0,99

$R^a$  coeficientul de corelație

### 5.1.1.3. Investigarea *in silico* privind interacțiunea dintre $\alpha$ -LA și $\beta$ -caroten, la nivelul de moleculă unică

Pentru experimentele de simulare a dinamicii moleculare s-a efectuat încălzirea proteinei la 25, 60 și 90°C și s-au echilibrat modelele astfel încât potențialele oscilații de energie să fie reduse la mai puțin de 0,1%.

Creșterea temperaturii de la 25 la 90°C a condus la creșterea energiei totale de la -364,34±0,72 kJ/mol la -286,21 ± 0,77 kJ/mol. În ceea ce privește structura inițială a moleculei cristaline, tratamentul termic până la 90°C a determinat o reducere semnificativă a lanțului  $\alpha$ -LA și a conținutului  $3_{10}$  helix. Datorită destabilizării termice, secvențele Tyr<sup>18</sup>-Gly<sup>20</sup> și Ile<sup>101</sup>-Tyr<sup>103</sup>,

inițial implicate în structurile elicoidale, au pierdut legătura de hidrogen specifică conformației elicoidale și s-au transformat în structuri  $\gamma$ -turn. Pe de altă parte, o nouă formă helix tip H a rezultat din transformarea  $\beta$ -turn a lanțului Asn<sup>57</sup>-Trp<sup>60</sup>. Datorită dispariției lanțului Ala<sup>40</sup>-Asn<sup>44</sup>, care leagă două structuri secundare diferite de rotire în modelul inițial, regiunea formată de Ser<sup>47</sup>-Gly<sup>51</sup> s-a transformat la temperatură ridicată într-o regiune intrinsecă dezordonată. În plus, rearanjările moleculare induse termic au favorizat formarea unor structuri secundare noi, cum ar fi o structură antiparalelă G1 (implicând Tyr<sup>50</sup>, Gln<sup>54</sup> și Ile<sup>55</sup>), modificând astfel conformația clusterului aromatic II și patru transformări inverse beta constând în patru resturi consecutive plasate la distanțe mai mici de 7 Å (Ser<sup>69</sup>-Asn<sup>71</sup>, Ser<sup>70</sup>-Ile<sup>72</sup>, Ile<sup>75</sup>-Cys<sup>77</sup> și Cys<sup>120</sup>-Lys<sup>122</sup>) (Chrysin și al., 2000; Vanhooren și al., 2006).

Tratamentul termic sever aplicat proteinei a determinat o ușoară reducere a suprafeței totale, față de modelul echilibrat la temperatura camerei (tabelul 5.4.). Aceste rezultate sugerează plierea parțială a structurii  $\alpha$ -LA la 90°C, însoțită de reducerea cu 5% a legăturilor de hidrogen ce stabilizează structura proteinei.

Particularitățile referitoare la interacțiunea și afinitatea dintre  $\alpha$ -LA tratată termic la diferite temperaturi și  $\beta$ -caroten au fost estimate după efectuarea simulărilor de andocare urmate de rafinarea complexelor. Nu s-au constatat diferențe semnificative la nicio temperatură simulată în ceea ce privește energia de legare între cele trei complexe. În tabelul 5.4. sunt redate detaliile de interacțiune pentru modelele  $\alpha$ -LA- $\beta$ -caroten, caracterizate prin cea mai mare suprafață totală de interacțiune și cele mai scăzute valori ale energiei de interacțiune. O analiză detaliată a complexelor de tip  $\alpha$ -LA- $\beta$ -caroten a indicat că proteina nu a suferit o schimbare majoră a elementelor din structura secundară și nu s-au produs evenimente moleculare responsabile de denaturarea sau destabilizarea proteinei în timpul interacțiunii cu ligandul.

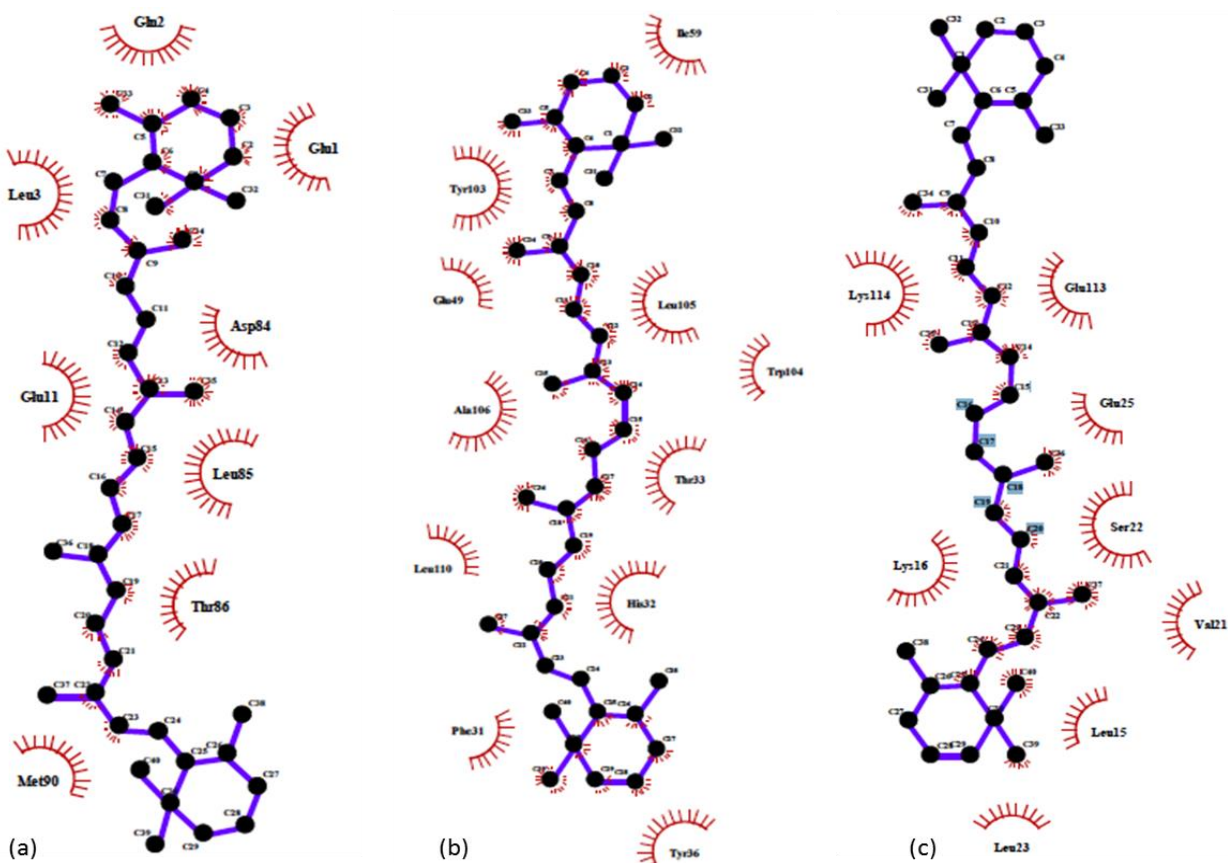
**Tabelul 5.4.** Descriptorii moleculari ai complexului  $\alpha$ -LA- $\beta$ -caroten obținuți în urma tratamentului termic

Descriptori	Temperatura, °C		
	25	60	90
<b>Descriptorii structurii secundare</b>			
Lanțuri (%)	9,8	8,2	3,3
$\alpha$ -helix (%)	28,7	25,4	29,5
3-10 helix (%)	7,4	8,2	2,5
Interacțiuni helix helix	92±5	88±5	87±5
<b>Descriptorii energetici și termodinamici</b>			
Legături energetice $\alpha$ -LA- $\beta$ -caroten, kJ·mol <sup>-1</sup>	-167	165,97	127,19
$\Delta G^f$ , kJ/mol	-415,05	-431,78	-432,21
$\Delta G^{int}$ , kJ/mol	-8,79	-10,04	-20,50
$T\Delta S^{diss}$ , kJ/mol	24,69	25,10	24,69
$\Delta G^{diss}$ , kJ/mol	-15,9	-15,06	-4,18



Suprafața descriptorilor			
Suprafața totală a proteinei, Å <sup>2</sup>	6648,6	6499,8	6527,8
Aria de acțiune a complexului α-LA-β-caroten	340,4	450,2	333,7

Analizând hărțile de contact prezentate în figura 5.12. se observă că în proteina echilibrată la 25°C, 60°C și 90°C s-au identificat situsuri de legare de β-caroten. Datorită modificărilor conformaționale induse de temperatură, cele trei modele nu au un resturi comune. În concordanță cu numărul de aminoacizi care interacționează cu ligandul, aria suprafeței care interacționează cu proteina a crescut de la 340,4 Å<sup>2</sup> (opt aminoacizi implicați în interacțiunea: Glu<sup>1</sup>, Gln<sup>2</sup>, Leu<sup>3</sup>, Glu<sup>11</sup>, Asp<sup>84</sup>, Leu<sup>85</sup>, Thr<sup>86</sup>, Met<sup>90</sup>) până la 450,2 Å<sup>2</sup> (11 atomi de aminoacizi: Phe<sup>31</sup>, His<sup>32</sup>, Thr<sup>33</sup>, Tyr<sup>36</sup>, Glu<sup>49</sup>, Ile<sup>59</sup>, Tyr<sup>103</sup>, Trp<sup>104</sup>, Leu<sup>105</sup>, Ala<sup>106</sup>, Leu<sup>110</sup>) la creșterea temperaturii de la 25 la 60°C și scade la 333,7 Å<sup>2</sup> (la opt aminoacizi Leu<sup>15</sup>, Lys<sup>16</sup>, Val<sup>21</sup>, Ser<sup>22</sup>, Leu<sup>23</sup>, Glu<sup>25</sup>, Glu<sup>113</sup>, Lys<sup>114</sup>) la temperaturi mai ridicate. Se pare că evenimentele moleculare înregistrate în structura proteinei tratate la temperatură ridicată au afectat proprietățile interfeței α-LA prin promovarea expansiunii cavităților în care s-a constatat că β-carotenul a interacționat.



**Figura 5.12.** Situsurile de legare din structura α-LA implicate în interacțiunea cu β-caroten. Proteina a fost încălzită preliminar la (a) 25°C, (b) 60°C și (c) 90°C. Aminoacizii din suprafața de legare α-LA care sunt implicați în contactele hidrofobe cu molecula β-carotenului sunt reprezentate de un arc cu spițe care radiază către atomii de ligand pe care îi contactează. Cifrele au fost extrase utilizând LigPlot +.



În acord cu observația lui [Loch și al. \(2013\)](#), care au efectuat studii termodinamice privind legarea acizilor grași nesaturați la  $\beta$ -LG, rezultatele noastre au arătat că procesul de formare a complexului  $\alpha$ -LA- $\beta$ -caroten este atât entalpic, cât și entropic, prin diferite evenimente cum ar fi interacțiunea dintre ligand și proteină sau modificări conformaționale ale componentelor din complexe. Creșterea temperaturii nu a determinat o modificare semnificativă a entropiei în corpul rigid ( $T\Delta S^{\text{diss}}$ ) la disocierea complexului  $\alpha$ -LA- $\beta$ -caroten, ceea ce indică faptul că stabilitatea sistemului care implică proteina denaturată nu a fost afectată. În comparație cu modelul echilibrat la 25°C, la temperaturi mai mari de 60°C s-a înregistrat o valoare a energiei de solvatare inferioară pentru proteina pliată ( $\Delta G^f$ ), ceea ce indică faptul că structura tratată termic este mai stabilă. Valorile negative ale energiei libere de solvatare responsabile cu formarea complexului ( $\Delta G^{\text{int}}$ ) corespund cu interfețele hidrofobe sau cu creșterea temperaturii tratamentului termic aplicat proteinei, indicând faptul că modificările care apar în structura proteică în urma tratamentului termic favorizează formarea complexului cu  $\beta$ -caroten. În plus, creșterea  $\Delta G^{\text{diss}}$  de la -15,90 la - 4,18 kJ/ mol indusă de creșterea temperaturii de la 25°C la 90°C (tabelul 5.4.) sugerează îmbunătățirea stabilității termodinamice a complexul  $\alpha$ -LA- $\beta$ -caroten.

## 5.2. Evaluarea mecanismului de legare dintre $\beta$ -lactoglobulina și compușii carotenoidici din extractul de cătină și evaluarea stabilității complexului în diferite condiții de mediu

### 5.2.1. Introducere

Scopul studiului a fost acela de a aprofunda mecanismele de legare și efectele tratamentului termic asupra complexului  $\beta$ -lactoglobulină-extract din cătină albă liofilizată (denumit în continuare  $\beta$ -LG-EC), în concordanță cu modificările structurale ale proteinei, în principal prin spectroscopia de fluorescență *in situ*. Metodele de spectroscopie de fluorescență au implicat utilizarea fluorescenței intensității intrinseci și extrinseci, a diagramei de fază, a spectrelor sincron, a spectroscopiei fluorescente tridimensionale și a experimentelor de quenching. Locurile de legare a  $\beta$ -carotenului la  $\beta$ -LG și efectul complexării asupra stabilității conformaționale și asupra structurii secundare a  $\beta$ -LG au fost evaluate pe baza experimentelor de quenching cu soluție de  $\beta$ -caroten pur, de andocare moleculară și simulare prin dinamică moleculară.

### 5.2.3. Materiale

$\beta$ -LG din lapte de bovină (de puritate 90%, variante genetice A și B),  $\beta$ -caroten, ANS au fost achiziționate de la Sigma (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO).

### 5.2.5. Rezultate și discuții

#### 5.2.1.1. Studiul capacității $\beta$ -LG de a lega carotenoizi în sisteme model

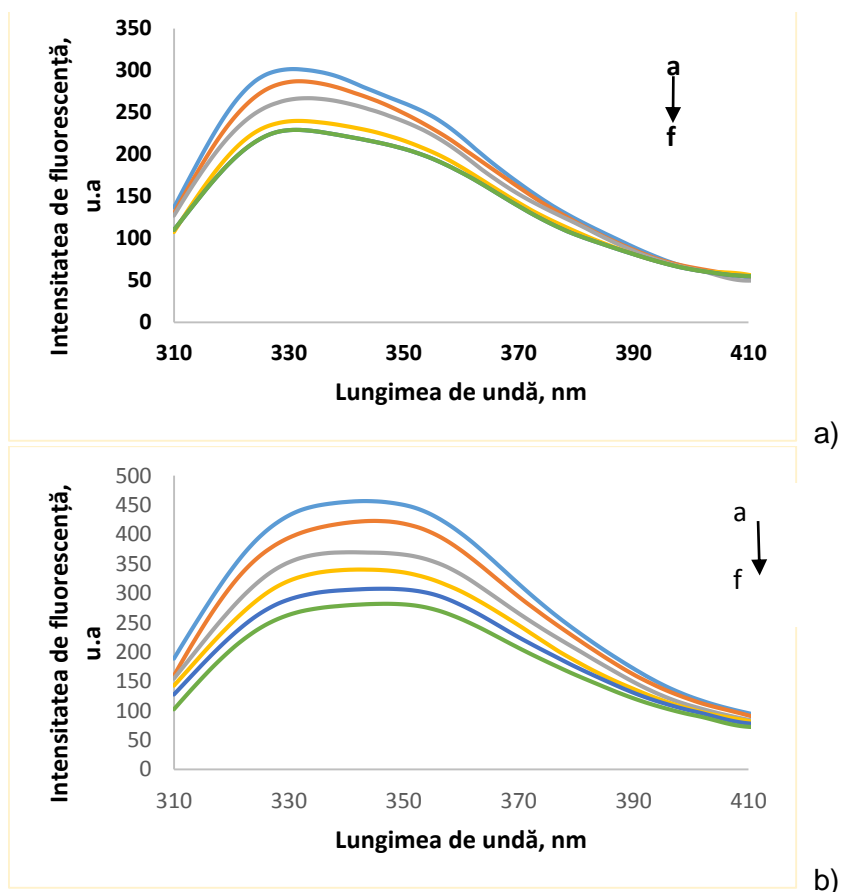
- **Mecanismul de legare a carotenoizilor din extractul de cătină de  $\beta$ -LG tratată termic**

Interacțiunile dintre  $\beta$ -LG și  $\beta$ -caroten au fost evaluate prin investigarea influenței creșterii concentrației de  $\beta$ -caroten asupra spectrelor de intensitate a fluorescenței  $\beta$ -LG care a fost tratată termic la temperaturi cuprinse între 25°C și 100°C timp de 15 min.

Se poate observa că soluția de  $\beta$ -caroten a stins fluorescența Trp-ului (figura 5.13). Acest fenomen s-a datorat probabil transferului de energie dintre inelul indol excitat (Trp) și liganzi sau a schimbărilor de polaritate din vecinătatea resturilor de Trp ([Muresan și al., 2001](#)). Conform

Mensi și al. (2013), resturile de Trp sunt blocate într-un mediu nepolar dacă emisia maximă de fluorescență ( $\lambda_{max}$ ) este mai mică de 330 nm. Dacă  $\lambda_{max}$  este mai mare de 330 nm, restul de Trp este localizat într-un mediu polar, care în majoritatea cazurilor implică expunerea la solvenți. Tratamentul termic la temperaturi mai mari de 70°C a soluției de  $\beta$ -LG, a determinat red-shifturi semnificative (de la 331 nm la 25°C până la 337 nm la 80°C, la 343 nm la 90°C și la 347 nm la 100°C), sugerând modificări structurale asociate expunerii resturilor de Trp.

Creșterea concentrației de  $\beta$ -caroten a determinat deplasarea lungimii de undă a emisie maxime de la 331 nm la 333 nm la 25°C și 60°C, iar la 80°C și, respectiv, 90-100°C s-a înregistrat red-shift de 7 nm și, respectiv, de 3-4 nm, indicând faptul că adăugarea  $\beta$ -carotenului a determinat pierderea structurii compacte a proteinei, expunând subdomeniul hidrofob unde sunt plasate resturile de Trp.



**Figura 5.13.** Spectrele de fluorescență ale interacțiunii dintre  $\beta$ -LG și  $\beta$ -caroten, tratate termic la 25°C (a) și 90°C (b). Concentrația  $\beta$ -carotenului a variat de la 0 la 0,093  $\mu$ M (a-f).

Pentru a elucida dacă mecanismul de legare între  $\beta$ -LG și  $\beta$ -caroten este dinamic sau static, s-au comparat valorile  $K_{SV}$  calculate la diferite temperaturi (tabelul 5.5). În intervalul de temperatură studiat, s-a putut observa o liniaritate ridicată, evidențiindu-se astfel faptul că stingerea emisie de fluorescență a  $\beta$ -LG de către  $\beta$ -caroten este statică. În intervalul de temperatură de 25°C până la 90°C, valorile  $K_{SV}$  au crescut de la  $3,48 \pm 0,55 \cdot 10^{-10}$  L/mol la

$6,83 \pm 0,24 \cdot 10^{-10}$  L/mol, iar la temperatura de  $100^\circ\text{C}$  s-a înregistrat o scădere a valorii  $K_{SV}$  ( $5,70 \pm 0,24 \cdot 10^{-10}$  L/mol).

**Tabel 5.5.** Parametrii de legare dintre  $\beta$ -LG tratată termic și  $\beta$ -caroten la diferite temperaturi

T( $^\circ\text{C}$ )	$K_{SV}(10^{-10}\text{L/mol})$	$R^b$	$K_b(10^{-8}\text{L/mol})$	$n$	$R^c$
25	$3,48 \pm 0,55^a$	0,996	$1,11 \pm 0,05$	$1,56 \pm 0,04$	0,992
50	$3,99 \pm 0,27$	0,989	$0,92 \pm 0,04$	$1,31 \pm 0,06$	0,999
60	$4,17 \pm 0,19$	0,996	$0,87 \pm 0,02$	$1,25 \pm 0,05$	0,991
70	$4,36 \pm 0,20$	0,996	$1,07 \pm 0,02$	$1,47 \pm 0,03$	0,993
80	$4,99 \pm 0,06$	0,993	$1,06 \pm 0,07$	$1,34 \pm 0,007$	0,990
90	$6,83 \pm 0,03$	0,994	$0,87 \pm 0,05$	$0,96 \pm 0,004$	0,998
100	$5,70 \pm 0,24$	0,995	$0,78 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,02$	0,998

<sup>a</sup> deviația standard

$R^b$  coeficientul de corelație pentru valorile  $K_{SV}$

$R^c$  coeficientul de corelație pentru valorile  $K_b$

Constantele aparente de legare ( $K_b$ ) ale complexului  $\beta$ -LG- $\beta$ -caroten și numărul de situsuri de legare ( $n$ ) sunt redate în tabelul 5.5. Valorile  $K_b$  au scăzut în urma creșterii temperaturii, de la  $1,11 \pm 0,05 \cdot 10^{-8}$  L/mol la  $25^\circ\text{C}$  la  $0,87 \pm 0,02 \cdot 10^{-8}$  L/mol la  $60^\circ\text{C}$ , sugerând că unele modificări au avut loc în jurul locurilor de legare, influențând capacitatea de legare dintre  $\beta$ -LG și  $\beta$ -caroten. Creșterea temperaturii la  $70^\circ\text{C}$  a indus creșterea constantei de legare, însă la temperaturi mai ridicate înregistrat scăderi ale valorilor  $K_b$ . Valorile  $K_b$  au fost în concordanță cu cele raportate de [Mensi și al. \(2013\)](#), care a comparat varianta B ( $1,23 \pm 0,10 \cdot 10^{-8}$  L/mol) cu varianta A ( $2,07 \pm 0,40 \cdot 10^{-8}$  L/mol). Valorile  $n$  pentru întregul interval de temperatură au variat între  $1,56 \pm 0,04$  la  $25^\circ\text{C}$  până la  $0,96 \pm 0,04$  la  $90^\circ\text{C}$ , prin urmare se poate concluziona că, indiferent de tratamentul termic aplicat, molecula de  $\beta$ -LG are cel puțin un situs de legare cu afinitate mare pentru  $\beta$ -caroten.

### 5.2.1.2. Studiul influenței tratamentului termic asupra stabilității complexului format între $\beta$ -LG-EC

#### ▪ Spectre sincron

În figurile 5.19 și 5.20 sunt prezentate spectrele sincron ale complexului, la diferite temperaturi la  $\Delta\lambda=15$  nm și  $\Delta\lambda=60$  nm. Modificările  $\lambda_{\text{max}}$  corespund schimbării polarității în jurul moleculelor cromofore. Adaosul de EC a provocat un blue-shift de la 300 nm la 293 nm în cazul Tyr și de la 280 nm până la 276 nm în cazul Trp.

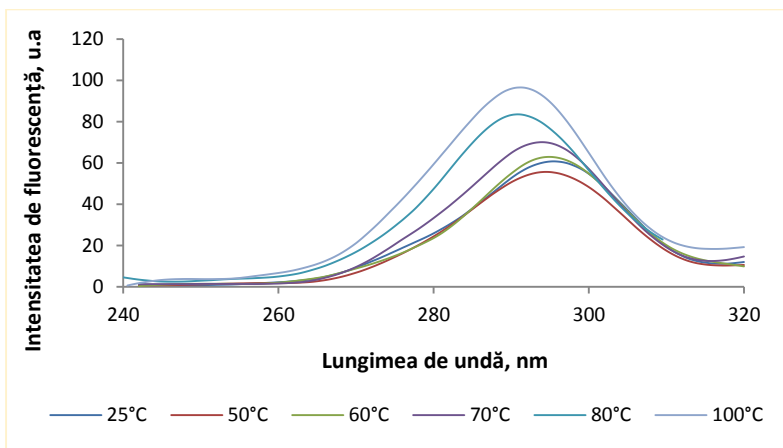


Figura 5.19. Spectrele sincron ale complexului  $\beta$ -LG-EC la  $\Delta\lambda=15$  nm

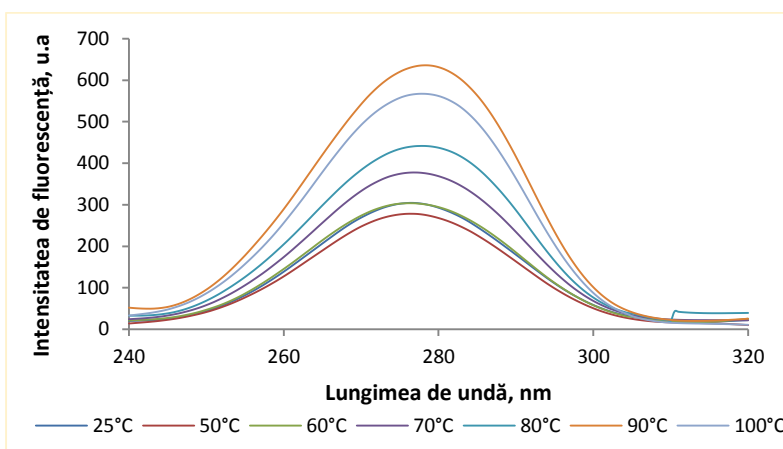


Figura 5.20. Spectrele sincron ale complexului  $\beta$ -LG-EC la  $\Delta\lambda=60$  nm

Din figura 5.19, se poate observa faptul că spectrul a avut un maxim la 293 nm la temperatura de 25°C, iar tratamentul termic la 90-100°C a indus un blue-shift de 2-3 nm. În figura 5.20, se evidențiază un red-shift de 2 nm pentru resturile de Trp. Prin urmare, se poate concluziona că tratamentul termic a indus modificări conformaționale care au condus la blocarea resturilor de Tyr și expunerea resturilor de Trp.

O analiză detaliată a modelelor utilizată pentru simularea comportamentului molecular al complexului  $\beta$ -LG -  $\beta$ -caroten au evidențiat faptul că gradul de expunere a resturilor de Trp la solvent scade odată cu creșterea temperaturii de la 25°C la 90°C. Datorită rearanjării lanțurilor laterale la temperaturi ridicate, s-a considerat că restul de Trp<sup>19</sup> a fost complet blocat în stare nativă, acesta a devenit parțial expus (suprafața accesibilă la solvent de 1,23 Å<sup>2</sup> la 90°C), în timp ce suprafața expusă a resturilor Trp<sup>61</sup> a scăzut de la 70,20 Å<sup>2</sup> la 25°C la 53,15 Å<sup>2</sup> la 90°C. În ceea ce privește resturile de Tyr, o creștere a suprafeței expuse de 27,11 Å<sup>2</sup>, 19,94 Å<sup>2</sup> și 0,97 Å<sup>2</sup> a Tyr<sup>20</sup>, Tyr<sup>102</sup> și Tyr<sup>42</sup> a fost observată la 90°C, față de proteina nativă. Pe de altă parte, suprafața accesibilă solventului a restului Tyr<sup>99</sup> a scăzut de la 64,70 Å<sup>2</sup> la 25°C până la 28,84 Å<sup>2</sup> la 90°C. De asemenea, este indicat faptul că polaritatea a scăzut în jurul resturilor Tyr și hidrofobicitatea a crescut, în timp ce polaritatea în jurul resturilor de Trp a crescut, iar hidrofobicitatea a scăzut (Hu și al., 2005).

### 5.2.1.3. Investigarea *in silico* privind interacțiunea dintre $\beta$ -LG și $\beta$ -caroten, la nivelul de moleculă unică

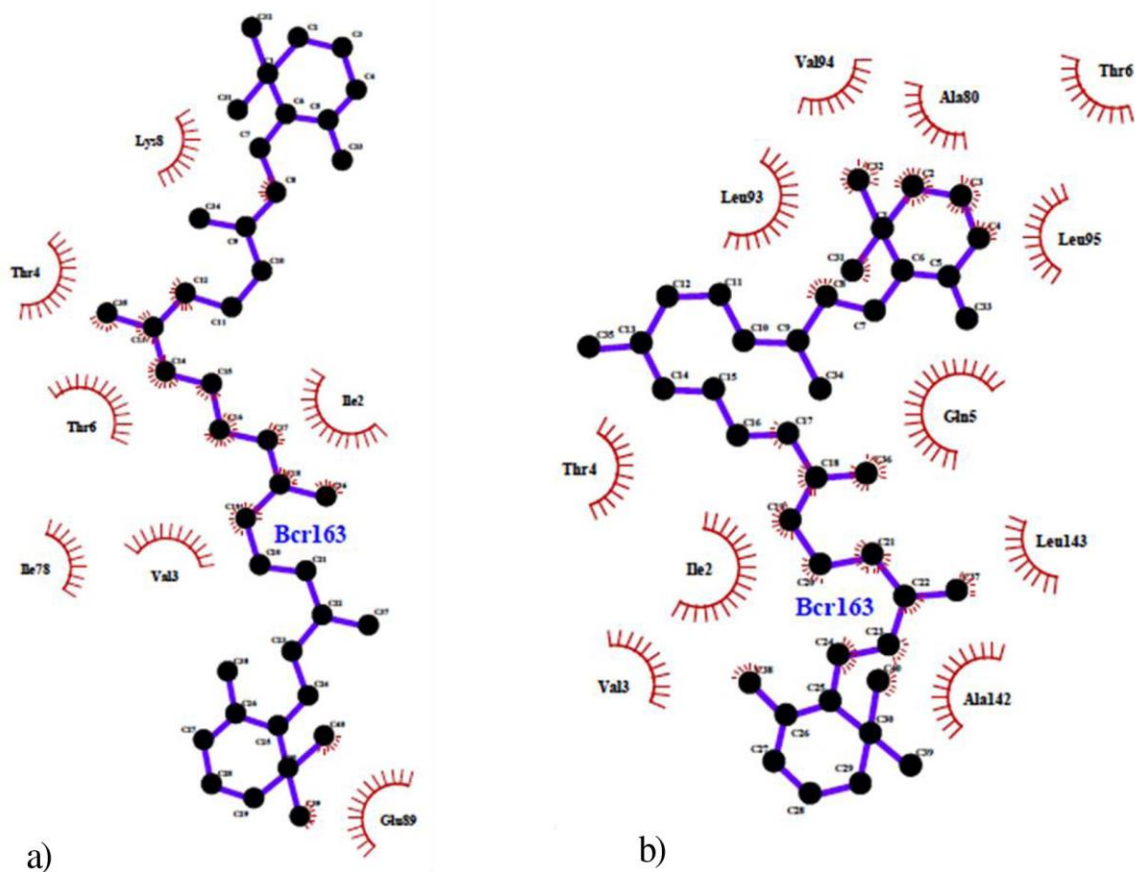
Evenimentele atomice responsabile de comportamentul termic al complexului format de  $\beta$ -LG și  $\beta$ -caroten (compusul reprezentativ al extractului de cătină), au fost verificate după efectuarea simulărilor de dinamică moleculară la 25 și 90°C, temperaturi indicate ca fiind relevante în studiile de fluorescență. O analiză detaliată a modelelor moleculare a arătat că numai 77% din structura secundară a  $\beta$ -LG native a fost conservată la 90°C. Încălzirea complexului  $\beta$ -LG- $\beta$ -caroten a condus la modificarea modului de legare a hidrogenului, determinând astfel implicarea resturilor de aminoacizi în definirea diferitelor tipuri de structuri secundare. Tratamentul proteinei la temperaturi ridicate a determinat creșterea aminoacizilor organizați în catene (de la 37,3% la 25°C până la 44,3% la 90°C), modificările cele mai evidente fiind transformarea în structuri  $\beta$  și  $\gamma$  turn. Comparativ cu modelul molecular inițial, tratamentul termic până la 90°C a favorizat rearanjări moleculare care au condus la formarea unor structuri  $\alpha$ -elicooidale native, modificând conformația 3-10 helix. Creșterea suprafeței totale accesibile solventului de la 7239,8 la 7976,1 Å<sup>2</sup> a avut loc în urma deplierii lanțurilor polipeptidice la temperaturi ridicate.

La 25°C molecula de  $\beta$ -caroten interferează direct cu următorii aminoacizi ai  $\beta$ -LG: Ile<sup>2</sup>, Val<sup>3</sup>, Thr<sup>4</sup>, Thr<sup>6</sup>, Lys<sup>8</sup>, Ile<sup>78</sup> și Glu<sup>89</sup>, Gln<sup>5</sup>, Ala<sup>80</sup>, Val<sup>81</sup>, Lys<sup>91</sup>, Leu<sup>93</sup>, Ser<sup>110</sup> și Gln<sup>115</sup>. Cea mai importantă contribuție la energia totală este dată de Lys<sup>8</sup> (0,81 kcal/mol), Ile<sup>78</sup> (0,39 kcal/mol) și Lys<sup>91</sup> (0,50 kcal/mol). În urma tratamentului termic, au fost observate ușoare modificări în situsul de legare, dar și o modificare a suprafeței totale a proteinei care a crescut de la 304,7 la 386,1 Å<sup>2</sup>, contribuind la formarea complexului cu  $\beta$ -caroten.

Când s-au comparat modelele echilibrate la 25°C și 90°C, s-a observat o creștere semnificativă a expunerii la solvent a resturilor de Ala<sup>80</sup> și Val<sup>81</sup> (de la 17,71 Å<sup>2</sup> la 25°C până la 79,30 Å<sup>2</sup> la 90°C) odată cu creșterea temperaturii (figura 5.22 b), precum și o creștere a interacțiunilor hidrofobe cu molecula de  $\beta$ -caroten. Datorită rearanjării moleculare, restul Lys<sup>8</sup> devine blocat în interiorul moleculei proteice și nu poate fi observată nicio interacțiune cu ligandul. Pe de altă parte, deși s-a observat o creștere a gradului de expunere datorită reorientării lanțului lateral, resturile de Glu<sup>89</sup> și Lys<sup>91</sup> nu au fost implicate în interacțiunea cu  $\beta$ -caroten la 90°C. Migrarea spre suprafața moleculei a restului Leu<sup>95</sup>, care a fost complet blocat în starea nativă, a favorizat extinderea interacțiunii pe întreaga suprafață expusă de 28,98 Å<sup>2</sup> cu unul dintre cele două inele de ciclohexen ale moleculei de  $\beta$ -caroten (figura 5.22 b). Schimbarea suprafeței de legare a ligandului a determinat mascarea resturilor de Ala<sup>142</sup>, Leu<sup>143</sup> și Pro<sup>144</sup> când se află în complex cu molecula de  $\beta$ -caroten, limitând astfel interacțiunea potențială cu alte molecule de  $\beta$ -LG (Adams și al., 2006).

În acord cu observația lui Loch și al. (2013), formarea complexului  $\beta$ -LG- $\beta$ -caroten a fost determinată de modificările de entalpie și entropiei, ce au constat în schimbări de conformație ale moleculelor atunci când se leagă. Faptul că a avut loc o scădere ușoară a entropiei complexului ( $T\Delta S^{\text{diss}}$ ) (de la 6 kcal/mol la 25°C până la 5,4 kcal·mol<sup>-1</sup> la 90°C) a indicat că stabilitatea complexului nu este semnificativ afectată de creșterea temperaturii. Pe de altă parte, creșterea energiei libere ( $\Delta G^{\text{diss}}$ ) a complexului de la -3,6 până la -2,5 kcal/mol a evidențiat faptul că acest complex este mai stabil din punct de vedere termodinamic, iar forțele externe de antrenare necesare pentru a disocia complexul sunt mai mari la 90°C. Mai mult, energia de solvatare a

plierii  $\beta$ -LG ( $\Delta G^\ddagger$ ) a scăzut de la -127 până la -154,4 kcal/mol, ceea ce indică faptul că structura proteinei tratată termic în complex este mai stabilă.



**Figura 5.22.** Suprafața de contact a complexului  $\beta$ -LG- $\beta$ -caroten echilibrat la 25°C (a) și 90°C (b)

### 5.3. Concluzii parțiale

Studiul de față a avut în vedere evaluarea avansată a mecanismelor de legare și a stabilității complexelor formate dintre principalele proteine din zer, respectiv  $\beta$ -lactoglobulina și  $\alpha$ -lactalbumina, din perspectiva îmbunătățirii stabilității compușilor carotenoidici extrași din surse naturale, respectiv cătină ca etape preliminare microîncapsulării.

Studiul a presupus o evaluare avansată bazată pe tehnici de spectroscopie de fluorescență, spectroscopie UV-vis și tehnici *in silico*.

Într-o primă etapă, s-a studiat mecanismul de legare dintre  $\alpha$ -lactalbumina din zer și compușii carotenoidici din extractul de cătină comparativ cu  $\beta$ -caroten prin spectroscopie de fluorescență, spectroscopie UV-vis și tehnici *in silico*.

Tratamentul termic al  $\alpha$ -lactalbuminei a avut o contribuție minoră în interacțiunea cu carotenoidele din extractul de cătină. Conform constantele de quenching, carotenoizii pot stinge fluorescența  $\alpha$ -lactalbuminei printr-un mecanism static.



Studiile UV-vis au arătat că adăugarea secvențială a extractului de cătină a condus la creșterea intensității absorbției la 280 nm, sugerând că interacțiunea dintre proteină și carotenoizi determină o depliere a lanțurilor polipeptidice.

Parametrii termodinamici au arătat că  $\Delta H$  contribuie în cea mai mare parte la  $\Delta G$ , ceea ce implică faptul că procesele de legare dintre molecule sunt determinate de modificările de entalpie.

Analiza detaliată la nivel de moleculă individuală, după efectuarea experimentelor de simulare prin dinamică moleculară prin tratamentul termic al moleculei de  $\alpha$ -lactalbumină la 90°C, a indicat o bună stabilitate termodinamică a complexului format cu  $\beta$ -caroten.

Modificările conformaționale induse de tratamentul termic în complexul  $\alpha$ -lactalbumină-extract de cătină în intervalul de temperatură 50°C -100°C au fost investigate utilizând metode de spectroscopie de fluorescență combinate cu abordarea *in silico*.

Experimentele de fluorescență intrinsecă au arătat că adăugarea de extract de cătină a determinat modificări conformaționale minore în structura proteinei.

Datele obținute în experimentele de fluorescență intrinsecă au indicat faptul că cea mai mare expunere a reziduurilor de Trp din  $\alpha$ -lactalbumină apar în urma tratamentului termic efectuat la temperatura de 60°C și la temperaturi peste 90°C. Studiile de quenching au evidențiat cea mai mare accesibilitate a cromoforilor intrinseci la acrilamidă și KI la 80°C și respectiv la 70°C.

În cadrul experimentelor de fluorescență extrinsecă, rezultatele au demonstrat că la temperatura de 80°C, ANS este plasat într-un mediu mai puțin hidrofob datorită interacțiunilor sale cu complexul format între proteină și carotenoizi.

Rezultatele experimentale *in silico* au arătat că formarea complexului este independentă de temperatură și carotenoizii din cătină albă nu se leagă în locații apropiate de resturile de Trp ale proteinei. Tratamentul termic a favorizat diferite evenimente moleculare care afectează interacțiunea dintre proteine și ligand și stabilitatea complexului.

În cazul complexului  $\beta$ -lactoglobulină-extract de cătină, rezultatele sugerează deplierea parțială a proteinei, în special la temperaturi mai mari de 80°C. În domeniul de temperatură studiat,  $\lambda_{max}$  a înregistrat red-shifturi, ceea ce indică o creștere a hidrofilicității în vecinătatea resturilor hidrofobe.

În ceea ce privește diagrama de faze, s-a evidențiat tranziția *all-or-none*, care a implicat disocierea dimerilor în intervalul de temperaturi 25°C-70°C, urmată de desfășurarea proteinei la temperaturi mai ridicate.

Legarea carotenoizilor și tratamentul termic a dus la scăderea polarității zonei adiacente resturilor de Tyr și la o creștere a hidrofobicității, în timp ce polaritatea zonei adiacente resturilor de Trp a crescut, iar hidrofobicitatea a scăzut.

Flexibilitatea moleculei proteice din complex a fost evidențiată prin constantele de quenching Stern-Volmer, care au prezentat valori mai mari la temperaturi ridicate, în cazul experimentelor de quenching cu acrilamidă, iar în cazul celor cu KI acestea au avut valori mai mici.

Rezultatele de dinamică moleculară au indicat că, indiferent de temperatura aplicată, complexul dintre moleculele  $\beta$ -lactoglobulină și  $\beta$ -caroten este stabilizat prin legături hidrofobe.

Evenimentele la nivel atomic care au loc în moleculele proteice la temperaturi ridicate au determinat modificări semnificative în situsul de legare pentru  $\beta$ -caroten, conducând astfel la un ansamblu mai stabil din punct de vedere termodinamic.

În ceea ce privește studiul în care s-a urmărit influența variației de pH în complexul  $\beta$ -lactoglobulină – extract de cătină, s-a putut observa că resturile de Trp au fost blocate în interiorul moleculei proteice, fenomen evidențiat de faptul că s-a redus intensitatea maximă a fluorescenței la lungimea de undă de excitare de 292 nm.

Resturile de Tyr au fost parțial expuse la solvent, deoarece  $\lambda_{max}$  a fost mai mare decât 330 nm. Fluorescența ANS a sugerat o expunere a resturilor hidrofobe la un mediu nepolar la pH neutru și alcalin. Spectrele sincron au evidențiat blocarea parțială a resturilor de Tyr în mediu alcalin și expunerea resturilor de Trp la un pH mai mare de 5,2. Experimentele de quenching cu acrilamidă au arătat o flexibilitate moleculară mai mare la pH acid, în timp ce în cazul experimentelor cu KI s-a obținut o valoare maximă a  $K_{SV}$  la pH 6,5.

Proprietățile remarcabile ale carotenoizilor din cătină fac acest ligand să fie considerat un ingredient valoros în industria alimentară. Aceste rezultate pot fi utilizate în formularea cererilor de produse lactate noi. Prin urmare, ingerarea de alimente bogate în carotenoizi, cum ar fi cătina, crește valoarea nutritivă a produsului finit prin furnizarea compușilor bioactivi. Datele obținute în acest studiu pot fi considerate valoroase în ceea ce privește obținerea de noi ingrediente funcționale sau prin adăugarea acestor ingrediente în diferite matrici alimentare.



## 6. Microîncapsularea compușilor carotenoidici din extractul de cătină albă în proteine din zer din perspectiva dezvoltării unor compozite funcționale cu aplicații în industria alimentară

### 6.1. Introducere

Scopul acestui studiu a fost acela de a încapsula componentele lipofile (carotenoizi din extractul de cătină albă) folosind ca material încapsulant proteinele din zer. Ulterior s-a determinat conținutul de carotenoizi din microparticule și eficiența încapsulării. Funcționalitatea pudrei a fost analizată și în ceea ce privește activitatea antioxidantă și culoarea. Pentru a stabili ce schimbări apar în structura particulelor s-a utilizat analiza spectrală FT-IR și microscopia confocală.

### 6.2. Materiale

Materialele utilizate pentru microîncapsularea compușilor bioactivi din extractul de cătină sunt: sistemul polimeric format din izolat proteic din zer și guma acacia, extract obținut din 50 g cătină liofilizată cu o umiditate de 6,87%.

Pentru microîncapsularea compușilor carotenoidici din extractul de cătină a fost utilizată metoda descrisă de [Jain și al. \(2015\)](#). Metoda presupune utilizarea unei soluții de izolat proteic din zer de concentrație 2% (IPZ) și soluție de gumă acacia 1% în apă ultrapură, amestecate în proporție de 1:1. Astfel, 100 mL de IPZ au fost supuși ultrasonificării timp de 10 minute la  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , pentru a facilita hidratarea proteinelor, ulterior soluțiile s-au menținut pe agitator (IKA RCT Basic, Germania) la  $40^\circ\text{C}$  timp de 20 minute. Etapa următoare a constat în adăugarea a 10 mL de extract de cătină dizolvat în ulei de negrilică și în omogenizare la 4000 rpm/30 min în vederea obținerii unei emulsii de tipul ulei în apă. În emulsie s-a adăugat 100 mL soluție de gumă acacia de concentrație 1% și s-a continuat agitarea timp de 30 de minute. Coacervarea s-a realizat prin ajustarea pH-ului soluțiilor la 3,75 cu soluție de HCl 1N, sub agitare mecanică continuă la 600 rpm. Amestecul obținut a fost răcit în baie de gheață sub agitare și ulterior depozitat la  $7^\circ\text{C}$  timp de 12 ore pentru a favoriza decantarea. Coacervatele obținute au fost liofilizate (CHRIST Alpha 1-4 LD plus, Germania) la  $-42^\circ\text{C}$  sub o presiune de 0,10 mBar timp de 48 de ore. Ulterior, pulberea a fost colectată și ambalată în pungi metalizate și păstrată la  $-20^\circ\text{C}$  până la utilizare.

### 6.6. Rezultate și discuții

#### 6.6.1. Caracterizare fitochimică a extractului de încapsulat

Extractul a fost caracterizat privind conținutul total de carotenoizi ( $57,54 \pm 0,28$  mg/g s.u.), activitatea antioxidantă ( $449,85 \pm 0,03$   $\mu\text{mol Trolox/g}$  s.u.), pH 4,0, substanță uscată  $80,3 \pm 0,54\%$  și conținutul de glucide ( $70,07^\circ\text{Brix}$ ).

Conform datelor obținute la punctul 4.6.1., în extractul de cătină au fost identificați 12 compuși, după cum urmează: astaxantina, zeaxantina, zeaxantina-palmitat,  $\gamma$ -caroten, cis  $\beta$ -caroten,  $\beta$ -criptoxantina, licopen, luteină-palmitat-miristat, luteină di-palmitat,  $\beta$ -caroten,  $\alpha$ -caroten și zeaxantină di-palmitat.  $\beta$ -carotenul a prezentat un conținut de 15,19 mg/g s.u., urmat de astaxantină cu 11,94 mg/g s.u.,  $\beta$ -criptoxantină cu 8,93 mg/g s.u. și licopen cu 2,24 mg/g s.u., în

timp ce zeaxantina a fost identificată în cea mai mare cantitate de 81,29 mg/g s.u. (Ursache și al., 2017b)

Mihalcea și al. (2017) au sugerat următoarele carotenoide și esteri în extractul obținut cu fluide supercritice (CO<sub>2</sub>) din cătină: astaxantină (3,58 ± 0,85 mg/g s.u.), zeaxantină (4,21 ± 0,78 mg/g s.u.), β-criptoxantină (8,11 ± 1,02 mg/g s.u.) (4,30 ± 0,65 mg/g s.u.), α-caroten (4,30 ± 0,96 mg/g s.u.), β-criptoxantină-palmitat (25,10 ± 2,52 mg/g s.u.), β-caroten cis (35,06 ± 2,36 mg/g s.u.) ± 1,36), zeaxantină di-palmitat (39,21 ± 1,47 mg/g s.u.) și zeaxantina-palmitat-miristat (31,01 ± 1,21 mg/g s.u.).

### 6.6.2. Eficiența încapsulării

Eficiența microîncapsulării compușilor carotenoidici din extractul de cătină a fost de 56,16 ± 1,24%. Mihalcea și al. (2017) au raportat o eficiență a încapsulării compușilor carotenoidici extrași din cătină prin tehnici de extracție cu fluide supercritice (CO<sub>2</sub>) de 41,34 ± 0,07% pentru probe încapsulate prin aceeași metodă și de 46,18±0,13% probe supuse unor reacții de cross-linking cu transglutaminază înainte de coacervare. Rodríguez-Huezo și al. (2004) au utilizat emulsii multiple, folosind apoi uscarea prin pulverizare și au obținut o eficiență a încapsulării variind de la 25,6% la 87,5% în funcție de conținutul total de solide și de raportul dintre amestecul de biopolimeri și emulsia primară. Un grad mai ridicat al eficienței de încapsulare cu proteine din zer și maltodextrină a fost raportat de Esfanjani și al. (2015) de 56,51 ± 0,31% pentru picrocrocină, 51,57 ± 0,29% pentru safranal și 62,55 ± 0,45% pentru crocină.

### 6.6.3. Caracterizarea pudrei microîncapsulate

Pudra obținută a prezentat un conținut de carotenoizi totali de 2,82 ± 0,17 g/g și activitatea antioxidantă de 548,00 ± 0,23 μmol Trolox/g s.u.

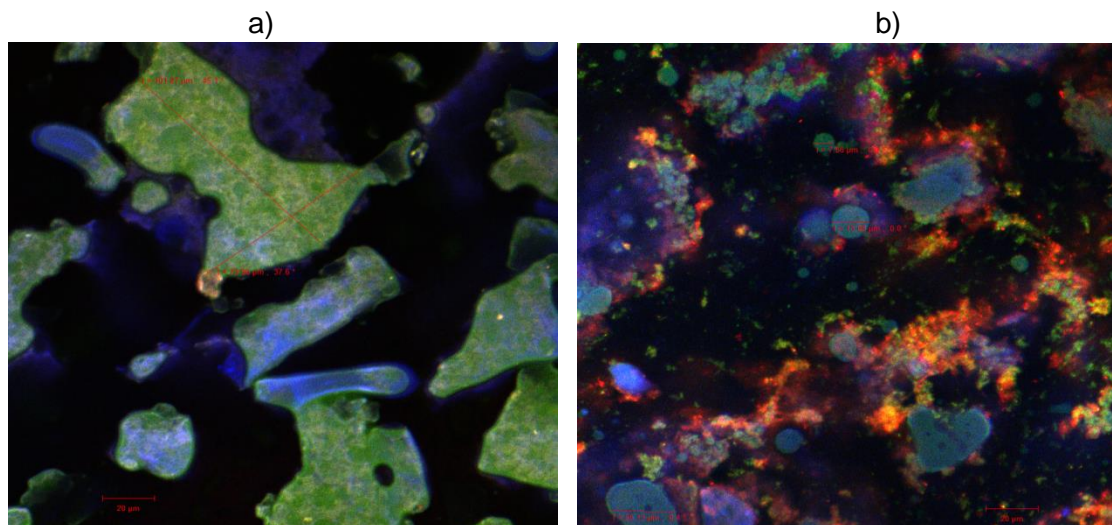
Procesului de încapsulare a determinat creștere a activității antioxidante (de la 449,85 ± 0,03 μmol Trolox/g s.u. la 548,00 ± 0,23 μmol Trolox/g s.u.).

Mihalcea și al. (2017) au sugerat valori ale activității antioxidante de 473,90 ± 5,01 μmol Trolox/g s.u. pentru proba obținută prin încapsularea extractului de cătină și 480,00 ± 2,80 μmol Trolox/g s.u. pentru proba tratată în prealabil cu transglutaminază.

### 6.6.4. Structura și morfologia microcapsulelor

Prin combinarea luminii albe cu o sursă de lumină laser, microscopia confocală este o tehnică capabilă să scaneze suprafețe și să capteze imagini optice la o rezoluție înaltă. Tehnica, în esență, scanează un obiect punct-cu-punct folosind un fascicul laser concentrat pentru a permite o reconstrucție 3D. Fructele de cătină sunt fructe de tip baca care conțin pigmenți carotenoizi ce găsesc în cromoplastele epicarpului și mezocarpului.

În ceea ce privește pudra nativă, se poate observa că pigmenții lipofili cum sunt carotenoidele formează împreună cu proteinele numeroase microvezicule ce se unesc sub forma unor coacervate de formă neregulată, cu dimensiuni cuprinse între 20-110 μm (figura 6.2. a). Atunci când carotenoizii au fost încapsulați în matricea proteinelor din zer, se formează sferozomi cu dimensiuni variabile, cuprinse între 2-30 μm (figura 6.1.b), probabil, datorită matricei de proteine care influențează dimensiunile picăturilor de ulei încorporate.

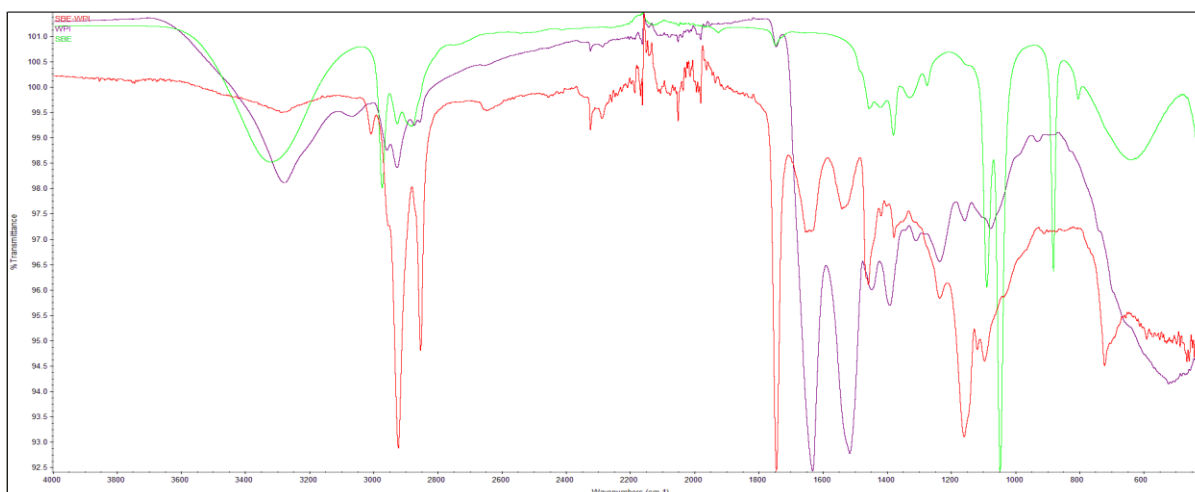


**Figura 6.2.** Imagini microscopice preluate cu CLSM LSM 710  
(a) pudra nativă și (b) complexul colorat cu fluorocromi

Unii sferozomi confluează și generează coacervate care depășesc diametru de 25  $\mu\text{m}$ . Prin urmare, sistemele noi de eliberare pe bază de emulsii pot fi realizate cu proteine din zer pentru a controla profilul de eliberare a compușilor lipofili în timpul digestiei, cu aplicații în alimentele funcționale (Mihalcea și al., 2017).

### 6.6.5. Analiza FT-IR

Spectroscopia de absorbție în infraroșu reprezintă o metodă de analiză utilizată în domeniul industriei alimentare ce presupune studiul structurii diferitelor clase de compuși, determinarea purității acestora cât și identificarea grupărilor biologic active sau formarea unor noi legături.



**Figura 6.3.** Spectrele ATR suprapuse (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) ale EC (roșu), izolat proteic din zer (purpuriu) și pudră microîncapsulată (verde)

Astfel, spectrul complexului izolat proteic din zer-extract din cătină (IPZ-EC) (figura 6.3) a evidențiat prezența unor benzi specifice a EC, la valori de 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  (întindere a legăturii

C-H, aceasta fiind o legătură specifică carotenoidelor),  $1750\text{ cm}^{-1}$  (întinderea legăturii C=O, grupare specifică esterilor, acizilor dicarboxilici etc.), cât și a unor benzi specifice pentru izolatul proteic din zer la valori de 1646, 1539, 1456 and  $1377\text{ cm}^{-1}$  (Ursache și al., 2017, Pretsch și al., 2009). De asemenea, apariția unei benzi mai late corespunzătoare legăturilor N-H/O-H la  $3200\text{ cm}^{-1}$  ar putea sugera formarea mai multor legături de H în cadrul coacervatelor obținute. O altă aplicație a analizei FT-IR este determinarea structurii secundare a proteinelor (Baltacioglu și al., 2017). Ulterior, în cadrul acestui studiu, tehnica ATR a fost utilizată pentru a analiza procesele de repliere a izolatului proteic din zer aferente procedurii de încapsulare (tabelul 6.2). Rezultatele indică o scădere a structurilor de tip  $\alpha$ -helix și  $\beta$ -foi pliate, sugerându-se astfel un anumit grad de agregare. Întrucât modificările conformaționale nu sunt semnificative, se poate considera că procesul de renaturare a proteinelor din cadrul complexului IPZ-EC a avut loc cu succes.

În tabelul 6.1. este redată structura secundară a coacervatelor (EC-IPZ) și a izolatului proteic (IPZ), calculată din cea de-a doua specie derivată, utilizând metoda lui Goormaghtigh și al. (2009).

**Tabelul 6.1.** Structura secundară a IPZ și a pudrei microîncapsulate

Structura secundară	IPZ (%)	Pudră microîncapsulată (%)
$\alpha$ -helix	25,73±1,67	21,42±1,39
$\beta$ -foi pliate	32,03±1,12	33,94±2,68
$\beta$ -turns	27,22±2,15	28,27±0,99
Structuri neoordonate	15,02±1,25	16,37±1,35

## 6.7. Concluzii parțiale

Extractul încapsulat a fost obținut din 50 g cătină liofilizată. Înainte de a fi microîncapsulat, extractul a fost caracterizat din punct de vedere fitochimic. Astfel, acesta a prezentat un conținut total de carotenoizi de  $57,54 \pm 0,28\text{ mg/g s.u.}$ , activitatea antioxidantă a fost  $449,85 \pm 0,03\text{ }\mu\text{mol Trolox/g s.u.}$ , pH-ul 4,0, substanță uscată  $80,3 \pm 0,54\%$  și conținutul de glucide înregistrat a fost  $70,07^\circ\text{Brix}$ .

Încapsularea carotenoidelor din extractul de cătină liofilizată s-a realizat prin coacervare urmată de liofilizare. S-a putut observa că materialele încapsulante utilizate (proteinele din zer și guma acacia), dar și metoda de încapsulare aleasă, s-au pretat foarte bine pentru obținerea pudrei, având în vedere că eficiența încapsulării carotenoidelor a fost  $56,16 \pm 1,24\%$ .

Microscopia cu scanare confocală laser a sugerat prezența carotenoidelor în interiorul matricei de proteine din zer, complexe având diverse dimensiuni cuprinse între 2 și  $30\text{ }\mu\text{m}$ . Cu toate acestea, unele sferoide au fuzionat împreună și au generat coacervate care au depășit diametrul de  $25\text{ }\mu\text{m}$ .

Spectrul specific FT-IR al coacervatelor a evidențiat benzi tipice pentru carotenoide, esterii, acizi dicarboxilici și proteine din zer, dar și formarea de noi legături de hidrogen în complex. De asemenea, analiza detaliată a structurii proteice a indicat o scădere a structurilor  $\alpha$ -helix și  $\beta$ -foi pliate, sugerând agregarea moleculelor într-o oarecare măsură.

Complexul microîncapsulat poate fi folosit cu ușurință în industria alimentară ca ingredient pentru obținerea de produse alimentare cu valoare adăugată, deoarece acesta nu necesită spațiu

mare de depozitare și poate fi dozat fără etape intermediare. De asemenea, se preconizează că utilizarea pudrei microîncapsulate va îmbunătăți proprietățile reologice și texturale ale produsului finit, pe lângă efectele benefice asupra sănătății.

## **7. Dezvoltarea unor tehnologii de obținere a produselor alimentare cu valoare adăugată prin exploatarea potențialului bioactiv al cătinei albe și a complexului carotenoidic microîncapsulat**

### **7.1. Aspecte generale**

Scopul acestui studiu îl reprezintă elaborarea a două tehnologii pentru brevetarea a două produse cu valoare adăugată care exploatează potențialul funcțional al cătinei și al extractului de cătină microîncapsulat, respectiv o tehnologie pentru obținerea unui produs lactat tip desert pe bază de concentrat proteic din zer și cătină și o tehnologie pentru obținerea unor brișe cu valoare adăugată. Acest studiu prezintă următoarele obiective: stabilirea rețetelor tehnologice de obținere a produselor, analiza comparativă a caracteristicilor fizico-chimice și de textură ale produselor și analiza caracteristicilor senzoriale ale brișelor cu valoare adăugată.

### **7.3. Materiale și metode**

#### **7.3.1. Obținerea produsului lactat tip desert pe bază de concentrat proteic din zer și cătină**

Componentele necesare obținerii produsului lactat tip desert sunt: lapte integral (3,5% grăsime), smântână dulce (cu 33% grăsime), zahăr, gălbenuș de ou, cu rol de emulgator, concentrat proteic din zer și cătină liofilizată în proporție de 2 - 6%.

Conform cererii de brevet, s-au dat 3 exemple de realizare a invenției (respectiv cu un conținut de cătină liofilizată de 2%, 4% și 6%). Având în vedere că cererea este în curs de acceptare la OSIM nu se pot da toate detaliile de obținere ale produsului.

#### **7.3.2. Obținerea brișelor cu valoare adăugată**

Pentru obținerea brișelor s-au utilizat următoarele materii prime și ingrediente: unt de cocos, gălbenuș de ouă, zahăr, lapte 3,5%, făină de grâu, făină de orez, pudră, esență de mentă, praf de copt, sare

Procedeul de obținere a brișelor cu valoare adăugată prezintă următoarele etape:

- amestecarea continuă a untului de cocos cu sare și zahăr alb, până se dizolvă zahărul și se obține o spumă;
- ulterior se adaugă pe rând ouălele și laptele (cu un conținut de grăsime de 3,5%), alternativ cu făina, praful de copt și esența de mentă;
- în final se încorporează pudra microîncapsulată (în proporție de 6%, raportată la cantitatea de făină), astfel încât compoziția să fie uniformă.

Compoziția obținută a avut o consistență moale, facilitând procedeul de turnare în forme speciale de brișe.

Coacerea a fost realizată într-un cuptor cu convecție, la 185°C, timp de 20 de minute. Pentru comparație, s-au efectuat și probe martor care au respectat aceeași tehnologie, dar în care nu s-a adăugat pudră microîncapsulată.



## 7.4. Rezultate și discuții

### 7.4.1. Caracterizarea fizico-chimică și funcțională a produsului lactat tip desert pe bază de cătină și concentrat proteic din zer

Produsul, conform invenției, are următoarea compoziție chimică: lipide între 12,26 și 13,46%, proteine între 10,96 și 11,11%, săruri minerale între 0,65 și 0,74% și glucide între 13,78 și 16,58%, totalizând un conținut de substanță uscată ce a variat între 38,85 și 40,65%.

Prin aplicarea invenției se obține un produs lactat tip desert care prezintă o compoziție nutrițională echilibrată datorită proteinelor din lapte, a concentratului proteic din zer și a gălbenușului de ou, a lipidelor din lapte și din smântână, precum și a carotenoizilor din cătină.

Conținutul de carotenoizi totali a variat odată cu creșterea procentului de cătină din produs. Astfel, cea mai mare valoare ( $4,15 \pm 0,05$  mg/100 g s.u.) a fost înregistrată la proba cu 6% cătină liofilizată, în timp ce pentru proba cu 2% cătină a fost determinată cea mai mică valoare ( $1,07 \pm 0,06$  mg/100 g s.u.). Se poate afirma faptul că proba cu 6% adaos de cătină liofilizată aduce un aport ridicat de carotenoizi, ceea ce face ca acest produs să fie o sursă importantă de compuși bioactivi cu proprietăți benefice pentru organismul uman.

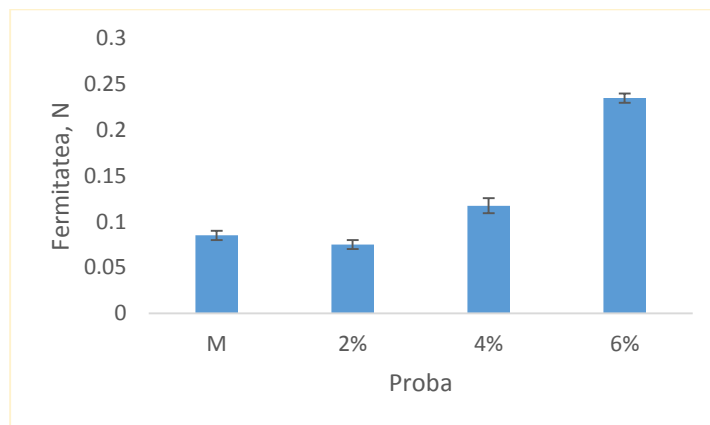
În ceea ce privește activitatea antioxidantă a produsului lactat tip desert, nu s-au înregistrat diferențe semnificative între probele analizate. Acest lucru poate fi explicat, probabil, prin faptul că emulsia obținută din gălbenușurile de ouă și concentratul proteic a favorizat înglobarea compușilor bioactivi din cătină.

### 7.4.2. Analiza texturală a produselor lactate pe bază de concentrat proteic și cătină

Analiza instrumentală a produselor lactate pe bază de concentrat proteic și cătină a vizat determinarea fermității, coezivității și elasticității probelor, ca răspuns la deformarea lor, realizată printr-o compresiune dublă (metoda TPA).

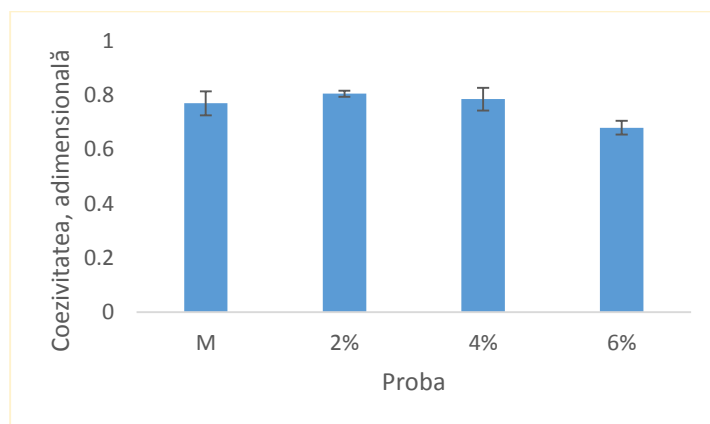
Fermitatea obținută prin analiza instrumentală reprezintă forța necesară comprimării gelului pentru o deformare prestabilă (în cazul de față 20 mm) (Trinth și Glasgow, 2012). În figura 7.5 sunt prezentate grafic valorile fermității pentru probele de produs lactat tip desert pe bază de concentrat proteic din zer și cătină. Pentru proba martor, fermitatea a înregistrat o valoare de 0,085 N. Adaosul de cătină liofilizată în procent de 2% a determinat scăderea ușoară a fermității la 0,0075 N. Creșteri mai accentuate ale fermității, cu 38% și 176%, s-au înregistrat pentru probele cu 4 și, respectiv, 6% adaos de cătină.





**Figura 7.5.** Valorile fermității obținute prin analiza instrumentală a texturii

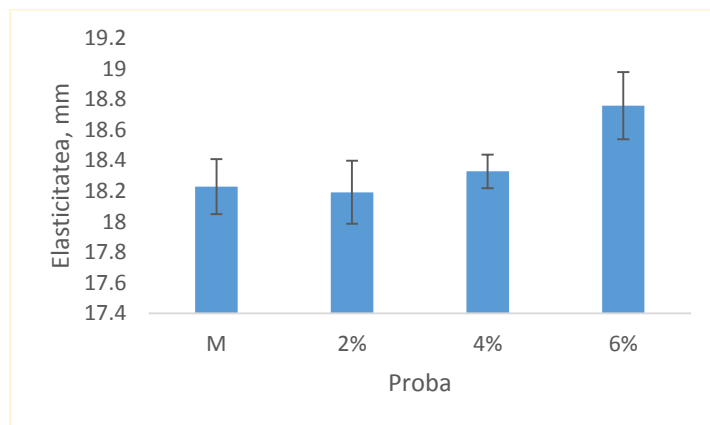
Coezivitarea ca parametru textural, reprezintă o măsură a rezistenței probei în timpul celei de a doua compresiuni, raportată la rezistența din timpul celei de a doua compresiuni. În figura 7.6. sunt prezentate valorile coezivității pentru cele patru probe analizate.



**Figura 7.6.** Valorile coezivității obținute prin analiza instrumentală a texturii

Pentru proba martor, coezivitatea a prezentat valoarea 0,77. La adaosul de 2% cătină liofolizată, coezivitatea a crescut până la 0,805, pentru ca la creșterea procentului de cătină adăugată până la 4 și 6%, să scadă la 0,785 și, respectiv, 0,68. Se poate constata o variație invers proporțională a coezivității cu fermitatea, comportament remarcant și de [Zheng și al., \(2017\)](#) pentru șarlota din lapte cu adaos de fibre din muguri de bambus.

În figura 7.7. sunt prezentate valorile elasticității, exprimate ca valoarea deformației recuperate între cele două cicluri de compresiune.



**Figura 7.7.** Valorile elasticității obținute prin analiza instrumentală a texturii

Influența adaosului de cătină liofilizată asupra elasticității este foarte asemănătoare cu influența asupra fermității. Dacă la adaosul de 2% cătină, elasticitatea probei a scăzut nesemnificativ față de elasticitatea probei martor, cea mai evidentă creștere a elasticității a fost înregistrată pentru proba cu 6% adaos de cătină. Acest comportament este asociat cu formarea unor legături elastice între elementele structurale ale gelului, atunci când este crescut procentul de cătină adăugată.

Din analiza parametrilor texturali obținuți instrumental, se poate concluziona că adaosul de cătină liofilizată, în procent peste 2%, duce la îmbunătățirea proprietăților texturale ale produselor.

#### 7.4.3. Caracterizarea funcțională și fizico-chimică a brișelor cu valoare adăugată

Brișele obținute cu pudră microîncapsulată au prezentat culoarea galben, nuanța acestora variind în funcție de procentul de pudră microîncapsulată adăugat.

Extractul de cătină și pudra microîncapsulată au fost caracterizate înainte de utilizare în brișe în ceea ce privește conținutul de umiditate, substanță uscată, carotenoizi totali și activitate antioxidantă (tabelul 7.2).

**Tabelul 7.2.** Caracteristicile fitochimice ale extractului de cătină și ale pudrei microîncapsulate

Ingredient	Substanță uscată (%)	Conținut de carotenoizi (mg/g s.u.)	Activitate antioxidantă ( $\mu\text{mol Trolox/g s.u.}$ )
<b>Extract de cătină</b>	80,30 $\pm$ 0,54	57,54 $\pm$ 0,28	449,85 $\pm$ 0,03
<b>Pudră microîncapsulată</b>	90,09 $\pm$ 0,47	2,82 $\pm$ 0,17	548,00 $\pm$ 0,23

În vederea determinării funcționalității brișelor, s-a determinat conținutul total de carotenoizi pentru toate probele, utilizându-se metoda descrisă de [Rodríguez-Huezo și al. \(2004\)](#). De asemenea, s-au determinat activitatea antioxidantă și parametrii de culoare.

Probele martor au prezentat un conținut total de carotenoizi de  $2,59 \pm 0,25 \mu\text{g}/100 \text{ g s.u.}$ , în timp ce brișele cu valoare adăugată au prezentat un conținut de carotenoizi de  $9,10 \pm 0,24 \mu\text{g}/100 \text{ g s.u.}$

În ceea ce privește activitatea antioxidantă, martorul a prezentat o valoare de  $141,03 \pm 6,38 \mu\text{M Trolox/g s.u.}$ , în timp ce brișele cu pudră microîncapsulată au prezentat o activitate antioxidantă de  $293,90 \pm 2,078 \mu\text{M Trolox/g s.u.}$  (Ursache și al., 2017)



Figura 7.8. Fotografii în secțiune transversală cu brișele obținute

#### 7.4.4. Analiza texturală a brișelor

Parametrii texturali analizați au fost: fermitatea (forța pentru o valoare dată a deformării), coezivitatea (rezistența alimentului în timpul celei de a doua compresiuni, raportată la rezistența în timpul primei compresiuni), elasticitatea (deformația care se recuperează între cele două cicluri de compresiune) și masticabilitatea (energia necesară dezintegrării alimentelor în timpul masticăției) (<http://texturetechnologies.com/resources/texture-profile-analysis#examples-of-graphs>).

În tabelul 7.4. sunt prezentate valorile parametrilor texturali pentru brișele cu pudră microîncapsulată și pentru brișele martor.

Tabel 7.4. Valorile parametrilor texturali ai brișelor

Parametrul textural, um	Martor	P1	P2
Fermitatea, N	$2,5 \pm 0,03^a$	$1,7 \pm 0,02^c$	$1,25 \pm 0,01^d$
Coezivitatea, adimensională	$0,33 \pm 0,03^d$	$0,51 \pm 0,01^b$	$0,65 \pm 0,02^a$
Elasticitatea, mm	$3,53 \pm 0,008^b$	$3,84 \pm 0,02^a$	$3,93 \pm 0,05^a$
Masticabilitatea, mJ	$2,82 \pm 0,07^c$	$3,17 \pm 0,02^{ab}$	$3,28 \pm 0,004^a$
Umiditatea pierdută la coacere, g	$10,81 \pm 2,76^a$	$10,31 \pm 0,41^{ab}$	$12,59 \pm 0,81^b$

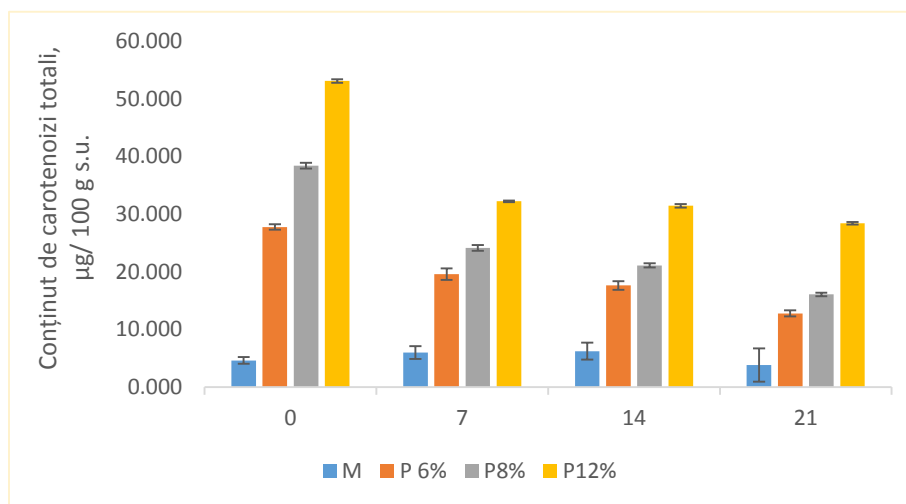
\*mediile care pe același rând nu împart aceeași literă sunt semnificativ diferite din punct de vedere statistic ( $p < 0.001$ ).

Adaosul de pudră microîncapsulată a determinat scăderea fermității proporțională cu procentul de pudră (de la 2,5 N pentru proba martor, la 1,25 N pentru proba cu 12% pudră). Acest comportament poate fi corelat cu porozitatea probelor, observată vizual: proba martor a prezentat o porozitate neuniformă, ceea ce a dus la înregistrarea unei rezistențe mai mari în timpul compresiunii. Ceilalți parametri texturali au înregistrat valori mai mari comparativ cu proba martor. Astfel, coezivitatea a crescut cu 97% pentru proba cu 12% adaos. Coezivitatea mai bună a probelor cu adaos de pudră microîncapsulată confirmă existența unor compuși cu rol în consolidarea legăturilor interne dintre elementele constitutive ale brișoșelor. Același lucru se poate constata și din observarea valorilor masticabilității, care cresc cu până la 16%. Masticabilitatea reprezintă energia depusă în timpul masticăției pentru a dezintegra proba. Elasticitatea brișoșelor este îmbunătățită de adaosul de pudră. Acest fapt poate fi asociat cu porozitatea mai mică și mai uniformă a probelor cu 8 și 12% pudră microîncapsulată. În urma analizei instrumentale a texturii brișoșelor se poate afirma faptul că proba cu 12% adaos de cătină a înregistrat cele mai bune valori ale parametrilor texturali.

#### 7.4.5. Evaluarea stabilității la depozitare a brișoșelor cu valoare adăugată

În vederea evaluării stabilității brișoșelor cu valoare adăugată în timpul depozitării, probele au fost analizate în ceea ce privește conținutul de carotenoizi totali, parametrii de culoare și activitatea antioxidantă. În acest sens, probele au fost ambalate în folie din plastic și depozitate la frigider timp de 21 de zile, parametrii sus menționați fiind determinați la fiecare 7 zile.

În figura 7.9. este prezentată variația conținutului de carotenoizi totali pe parcursul celor 21 de zile de depozitare.

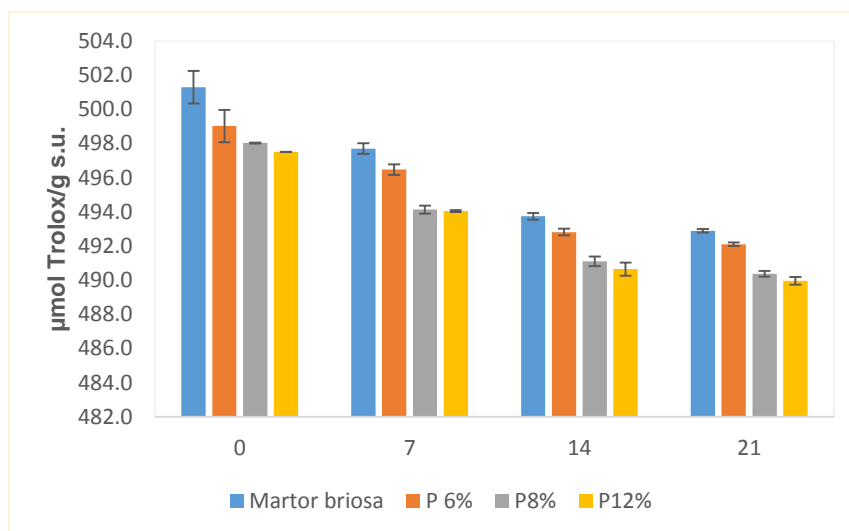


**Figura 7.9.** Variația conținutului de carotenoizi totali la depozitarea brișoșelor cu valoare adăugată

Din figura 7.9. se poate observa la P1 o scădere cu aprox. 38% a conținutului de carotenoizi totali în primele 7 zile de depozitare și cu 45% după 14 zile. De asemenea, în ziua 21 de depozitare s-a observat o scădere cu aprox. 58%, fenomen cauzat, probabil, de reacțiile de degradare. Și în cazul P2, s-au evidențiat scăderi ale conținutului de carotenoizi totali pe parcursul

delor 21 de zile de depozitare. Astfel, după 7 zile de depozitare s-a înregistrat o scădere a conținutului de carotenoizi totali cu aprox. 39%, cu 41% după 14 zile și cu 46% după 21 de zile. Se poate afirma faptul că în cazul P2 conținutul de carotenoizi totali a scăzut mai puțin și mai lent, comparativ cu P1.

În figura 7.10. este prezentată variația activității antioxidante pe parcursul celor 21 de zile de depozitare. Se poate observa, de asemenea, o scădere a activității antioxidante, probabil datorită variației concentrației de carotenoizi totali.



**Figura 7.10.** Variația activității antioxidante la depozitarea brișoșelor cu valoare adăugată

Din figura 7.10. se poate observa o scădere cu aproximativ 36% a activității antioxidante în primele 7 zile de depozitare și cu 53% după 14 zile, probabil datorită reacțiilor de degradare a carotenoizilor, responsabili în mare parte de activitatea antioxidantă a produselor. O ușoară creștere s-a observat în ziua 21 de depozitare, de asemenea fără semnificație statistică.

## 7.5. Concluzii parțiale

Produsul lactat tip desert pe bază de cătină și concentrat proteic a fost realizat în 3 variante: 2%, 4% și respectiv 6% adaos cătină liofilizată. Aceste produse au prezentat următoarea compoziție chimică: lipide între 12,26 și 13,46%, proteine între 10,96 și 11,11%, săruri minerale între 0,65 și 0,74% și glucide între 13,78 și 16,58%, iar substanță uscată a variat între 38,85 și 40,65%. Conținutul de carotenoizi a variat în funcție de procentul de cătină adăugat între  $1,07 \pm 0,06$  mg/100 g s.u. și  $4,15 \pm 0,05$  mg/100 g s.u. Activitatea antioxidantă înregistrată a variat foarte puțin între 496,96 pentru proba cu 2% cătină și 495,32 pentru proba cu 6%.

Analiza instrumentală a produselor lactate pe bază de concentrat proteic din zer și cătină a vizat determinarea fermității, coezivității și elasticității probelor, ca răspuns la deformarea lor, realizată printr-o compresiune dublă (metoda TPA). Din analiza acestor parametrii texturali, se poate concluziona că adaosul de cătină liofilizată, în procent peste 2%, a îmbunătățit proprietățile texturale ale produselor lactate pe bază de cătină și concentrat proteic din zer.

Brioșele cu valoare adăugată obținute au avut un conținut satisfăcător de carotenoide totale și activitate antioxidantă.

Analiza texturală a sugerat că adăugarea de pudră microîncapsulată a determinat creșterea fermității care a fost corelată cu porozitatea probelor. Coeziunea și elasticitatea brioșelor cu pudra microîncapsulată adăugată au fost mai scăzute comparativ cu proba martor, fiind corelate cu legarea mai slabă între constituenți, ceea ce ar putea provoca o textura fragilă.

Analiza senzorială a arătat că ambele eșantioane prezintă un gust similar. Proba cu pudră microîncapsulată a fost preferată de toți participanții, deoarece pudra microîncapsulată adăugată a îmbunătățit aspectul brioșelor, atât din punct de vedere textural cât și vizual.

În timpul celor 21 de zile de depozitare s-a putut observa că nu au avut loc modificări semnificative în ceea ce privește conținutul de carotenoizi totali și activitatea antioxidantă. Nici în cazul parametrilor de culoare ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) nu s-au înregistrat modificări semnificative.

## Concluzii generale

- ✦ Studiile de cercetare au vizat obținerea unor compozite funcționale pe bază de extracte din cătină (*Hippophae rhamnoides*) cu obținerea unor produse alimentare cu valoare adăugată.
- ✦ Inițial experimentele au constatat în extracția, caracterizarea și cuantificarea compușilor fitochimici din extractul de cătină, precum și investigarea stabilității compușilor bioactivi din cătină (*H. rhamnoides*) la diferite regimuri termice din perspectiva utilizării ca ingrediente în produse alimentare sau nutraceutice.
- ✦ Tehnicile de fluorescență și spectroscopie FT-IR au evidențiat complexitatea structurală a extractului de cătină. Tratamentul termic, conform studiilor spectrofluorimetrice, a provocat modificări ale lungimilor de undă maxime la emisie, indicând caracterul secvențial al modificărilor structurale ale compușilor fitochimici, în timp ce ATR-ul probelor a relevat o stabilitate termică ridicată.
- ✦ Studiile de cinetică de degradare au evidențiat faptul că polifenolii și, respectiv, carotenoizii sunt stabili la tratament termic, în timp ce flavonoidele și activitatea antioxidantă prezintă o stabilitate termică mai mică.
- ✦ Ulterior s-au investigat mecanismele de legare dintre principalele proteine din zer ( $\alpha$ -LA și  $\beta$ -LG) și carotenoizii din extractul de cătină, precum și evaluarea stabilității complexelor formate în diferite condiții de pH și tratament termic, din perspectiva îmbunătățirii stabilității compușilor carotenoidici extrași din cătină ca etape preliminare microîncapsulării.
- ✦ În cazul experimentelor cu  $\alpha$ -lactalbumina, studiul s-a bazat pe tehnici de spectroscopie de fluorescență, spectroscopie UV-vis și tehnici *in silico*. Astfel, s-a putut observa faptul că tratamentul termic nu a indus influențe majore în interacțiunea  $\alpha$ -lactalbuminei cu carotenoizii de extractul de cătină. Studiile UV-vis au evidențiat faptul că intensitatea absorbției la 280 nm a crescut odată cu adăugarea secvențială de extract de cătină. Acest lucru a evidențiat faptul că interacțiunea dintre proteină și extractul din cătină au condus la deplierea lanțurilor polipeptidice. Concluzia în urma experimentelor de fluorescență intrinsecă a fost că adaosul de extract de cătină induce modificări conformaționale minore în structura proteinei.

- ✦ Rezultatele experimentale *in silico* au evidențiat că temperatura tratamentului termic nu influențează formarea complexului, însă tratamentul termic a favorizat diferite evenimente moleculare care au afectat interacțiunea dintre proteine și ligand și stabilitatea complexului. De asemenea, conform experimentelor, carotenoizii din extractul de cătină albă nu se leagă în vecinătatea resturilor de Trp ale proteinei.
- ✦ În cazul complexului  $\beta$ -lactoglobulină-extract de cătină, rezultatele au sugerat că tratamentul termic a determinat deplierea parțială a proteinei, în special la temperaturi mai mari de 80°C. Legarea carotenoizilor și tratamentul termic au dus la scăderea polarității zonei adiacente resturilor de Tyr și la o creștere a hidrofobicității, în timp ce polaritatea zonei adiacente resturilor de Trp a crescut, iar hidrofobicitatea a scăzut.
- ✦ Rezultatele de dinamică moleculare au indicat că, indiferent de tratamentul termic aplicat, legăturile hidrofobe sunt cele care stabilizează complexul dintre moleculele  $\beta$ -lactoglobulină și  $\beta$ -caroten. Modificările la nivel atomic care au loc în moleculele proteice în urma tratamentului termic mai sever, au indicat formarea unui complex mai stabil din punct de vedere termodinamic.
- ✦ Variația pH-ului în complexul  $\beta$ -lactoglobulină – extract de cătină, a determinat blocarea resturilor de Trp în interiorul moleculei proteice, fenomen evidențiat de o scădere a intensității maxime a fluorescenței la lungimea de undă de excitare de 292 nm.
- ✦ Încapsularea carotenoizilor din extractul de cătină liofilizată s-a realizat prin coacervare urmată de liofilizare, obținându-se o valoare a eficienței încapsulării satisfăcătoare ( $56,16 \pm 1,24\%$ ).
- ✦ Microscopia cu scanare confocală laser evidențiat prezența carotenoidelor în interiorul matricei de proteine din zer.
- ✦ Spectrul specific FT-IR al coacervatelor a indicat benzi tipice pentru carotenoizi, esteri, acizi dicarboxilici și proteine din zer, dar și formarea de noi legături de hidrogen în complex.
- ✦ Analizele texturale realizate pe produse au condus la concluzia că adăugarea pudrei microîncapsulate în produse îmbunătățește proprietățile reologice și textuale ale produsului finit, pe lângă efectele benefice asupra sănătății.



## Contribuții originale și perspective de continuare a cercetărilor

Teza de doctorat a avut ca obiective principale evaluarea stabilității compușilor biologic activi din extractul de cătină (*H. rhamnoides*), evaluarea modificărilor structurale ale extractelor induse de tratamentul termic și pH cu ajutorul spectroscopiei de fluorescență (spectre de emisie); cinetica de degradare termică a compușilor biologic activi din cătină. Astfel, cunoașterea parametrilor și a condițiilor de prelucrare (temperatură, pH și timp) poate contribui la obținerea unei game largi de produse alimentare cu valoare adăugată.

Noutatea acestui studiu constă în obținerea unui ingredient pe bază de extract de cătină și izolat proteic din zer ce ar putea fi folosit în diverse produse alimentare pentru a le crește valoarea nutritivă. Potențialul aplicativ al ingredientului (pudră microîncapsulată) s-a evidențiat prin obținerea unor brioșe cu adaos și fără adaos de pudră microîncapsulată. S-a putut observa că brioșele cu adaos de pudră microîncapsulată au fost mai apreciate din punct de vedere senzorial comparativ cu cele fără adaos de pudră. De asemenea, s-a demonstrat faptul că brioșele îmbogățite cu pudră microîncapsulată au fost satisfăcătoare din punct de vedere microbiologic pe toată durata depozitării.

## Diseminarea rezultatelor cercetărilor

### A. Articole publicate în reviste cotate ISI

**Ursache, F.M.**, Ghinea, I.O., Turturică, M., Aprodu, I., Râpeanu, G., Stănciuc, N. (2017). Phytochemicals content and antioxidant properties of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) as affected by heat treatment - Quantitative spectroscopic and kinetic approaches, *Food Chemistry*, 233, 442–449.

**Ursache, F.M.**, Dumitrașcu, L., Aprodu, I., Stănciuc, N. (2017). Screening the thermal stability of carotenoids- $\alpha$  lactalbumin complex by spectroscopic and molecular modeling approach. *Journal of Macromolecular Science, Part A - Pure and Applied Chemistry*, 54, 316-322.

Dumitrașcu, L., **Ursache, F.M.**, Stănciuc, N., Aprodu, I. (2016). Studies on binding mechanism between carotenoids from sea buckthorn and thermally treated  $\alpha$ -lactalbumin. *Journal of Molecular Structure*, 1125, 721-729, 10.1016/j.molstruc.2016.07.070.

Aprodu I., **Ursache, F.M.**, Turturică, M., Râpeanu, G., Stănciuc, N. (2017). Thermal stability of the complex formed between carotenoids from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) and bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 173, 562-571.

**Ursache, F.M.**, Andronoiu, D.G., Ghinea, I.O., Barbu, V., Ioniță, E., Dumitrașcu, L., Botez, E., Râpeanu, G., Stănciuc, N. 2018. Valorizations of carotenoids from sea buckthorn extract by microencapsulation and formulation of value-added food products. *Journal of Food Engineering*, 219, 16-24.

### B. Articole publicate în reviste cotate BDI

**Ursache, M.F.**, Botez, E., Râpeanu, G., Stănciuc, N. (2017). pH induced structural changes of the complex formed between carotenoids from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) and bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI – Food Technology*, accepted for publication.

### C. Abstracte publicate în jurnale cotate ISI

Stănciuc, N., **Ursache, F.M.**, Dumitrașcu, L. (2016). Contribution to the binding mechanism of carotenoids from sea buckthorn to the thermally treated  $\alpha$ -lactalbumin. *Journal of Biotechnology*.

### D. Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale

**Ursache, F.M.**, Stănciuc, N., Ghinea, I.O., Râpeanu G., Botez, E. (2017). Total carotenoids content degradation from *H. rhamnoides* on a kinetic basis. The 8th International Symposium EuroAliment, Dunarea de Jos University of Galati, 8-9 September, Galati, Romania, poster presentation.

Stănciuc, N., **Ursache, F.M.**, Dumitrașcu, L. (2016). Contribution to the binding mechanism of carotenoids from sea buckthorn to the thermally treated  $\alpha$ -lactalbumin, *European Biotechnology Congress 2016*, Riga, Latvia, 05 – 07 May 2016, poster presentation.

Stănciuc, N., **Ursache, F.M.**, Dumitrașcu, L. (2016). Probing the thermal stability of  $\alpha$ -lactalbumin-carotenoids complex by fluorescence spectroscopy techniques. 18th IUFOST – World Congress of Food Science and Technology, 21st - 25th August 2016, Dublin, Ireland, poster presentation.

**Ursache, F.M.**, Oancea, A.M., Râpeanu, G., Stănciuc, N. (2016). Thermal degradation of the total carotenoid content and antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) – a kinetic study, 8th Congress Pigments in Food "Coloured food for health benefits", 28 June – 1 July, Cluj Napoca, Romania, poster presentation.

Stănciuc, N., **Ursache, F.M.**, Aprodu, I., Râpeanu, G. (2016). Exploring the binding affinity between bovine  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -carotene by using fluorescence spectroscopy and molecular modelling techniques. International Conference of Physical Chemistry ROMPHYSICHEM 16, September 21-24, 2016, Galați, Romania, poster presentation.

Stănciuc, N., Dumitrașcu, L., Râpeanu, G., **Ursache, F.M.** (2016). Thermal stability of the complex formed by bovine alpha-lactalbumin and carotenoids from sea buckthorn. International Conference of Physical Chemistry ROMPHYSICHEM 16, September 21-24, 2016, Galați, Romania, poster presentation.

#### **E. Lucrări comunicate la manifestări științifice naționale**

**Ursache, M.F.**, Stănciuc, N., Râpeanu, G., Aprodu, I., Botez, E. (2016). Investigations of structural changes in carotenoids -  $\beta$ -lactoglobulin complex induced by heat treatment using fluorescence spectroscopy. PhD student conference CSSD-UDJG, Dunărea de Jos University of Galați, Romania, 2<sup>nd</sup>-3<sup>th</sup> of June 2016.

**Ursache F.M.**, Stănciuc N., Nistor O.V., Botez E. (2015). Preliminary investigations on the effect of pH on the stability of  $\beta$ -carotene from *Hippophae rhamnoides*. PhD student conference CSSD-UDJG, Dunărea de Jos University of Galați, Romania.

#### **F. Brevete de invenție**

**Ursache, F.M.**, Botez, E., Stănciuc, N., Andronoiu, D.G., Nistor, O.V, Turturică, M., Râpeanu, G. Desert dairy product based on whey protein concentrate and sea buckthorn and method for making it off. OSIM registration number A/00045/2017.

**Ursache, F.M.**, Stănciuc, N., Botez, E., Andronoiu, D.G., Dumitrașcu, L., Râpeanu, G. Muffins with added-value by valorization of bioactive potential of microencapsulated carotenoids from sea buckthorn within whey protein and the obtaining technologies.

#### **G. Alte publicații**

Oancea, A.M., **Ursache, F.M.**, Râpeanu, G., Stănciuc, N. (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 June – 1 July, Cluj Napoca, Romania.

Nistor O.V., Andronoiu D.G., Mocanu G.D., **Ursache F.M.**, Stoica-Chirică M., Botez E. (2016). The effect of cranberries (*Vaccinium vitis idaea*) supplementation on physicochemical, textural and sensorial properties of ice cream. International Scientific Conference on Microbial Biotechnology 3rd edition of October 2016.

Andronoiu D.G., Nistor O.V., Mocanu G.D., **Ursache F.M.**, Matei (Bujeniță) V., Botez E. (2016). Cranberries (*Vaccinium vitis idaea*) potential to develop new functional dairy desserts. International Scientific Conference on Microbial Biotechnology 3rd edition of October 2016.

**Ursache F.M.**, Stănciuc N., Nistor O.V., Botez E. 2015. Evaluation of Anthocyanins Thermal Degradation in *Prunus spinosa* on Fluorescence Spectroscopy Basis. Journal of Biotechnology 208:S70, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.06.213.

**Ursache, F.M.**, Nistor, O.V., Bratu, M., Botez, E., Stănciuc, N. (2016). Probing the Heat-induced Structural Changes of Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy and Molecular Modeling. International Journal of Dairy Technology.