

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



TEZĂ DE DOCTORAT

**Cercetări privind obținerea de produse funcționale
destinate persoanelor cu intoleranțe alimentare**

**Doctorand,
Carmen-Alina BOLEA**

**Conducător științific,
Prof.univ.dr.ing Camelia VIZIREANU**

Seria I.1: BIOTEHNOLOGII Nr. 8

GALAȚI

2018

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



TEZĂ DE DOCTORAT

**Cercetări privind obținerea de produse funcționale
destinate persoanelor cu intoleranțe alimentare
(Rezumatul tezei de doctorat)**

**Doctorand,
Carmen-Alina BOLEA**

**Conducător științific,
Prof.univ.dr.ing Camelia VIZIREANU**

Seria I.1: BIOTEHNOLOGII Nr. 8

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

| | |
|---|-----------|
| Introducere..... | 1 |
| I. STUDIUL DOCUMENTAR..... | 8 |
| 1. Caracteristicile orezului negru..... | 9 |
| 1.1. Considerații generale..... | 9 |
| 1.2. Compoziția chimică a orezului negru..... | 12 |
| 2. Clasificarea compușilor biologic activi..... | 16 |
| 2.1. Antocianii..... | 16 |
| 2.2. Polifenolii..... | 20 |
| 2.3. Flavonoidele..... | 22 |
| 2.4. Activitatea antioxidantă..... | 24 |
| 3. Conceptul de aliment funcțional..... | 27 |
| 4. Intoleranța la gluten (boala celiacă)..... | 32 |
| 4.1. Importanța dezvoltării produselor fără gluten..... | 33 |
| 4.2. Considerații specifice în dezvoltarea produselor fără gluten pentru pacienții cu boală celiacă..... | 33 |
| 4.3. Valoarea nutrițională a produselor fără gluten..... | 34 |
| Referințe bibliografice..... | 36 |
| II. PARTEA EXPERIMENTALĂ..... | 46 |
| 5. Caracterizarea făinii de orez negru..... | 47 |
| 5.1. Considerații generale..... | 47 |
| 5.2. Materiale..... | 48 |
| 5.2.1. Materiale..... | 48 |
| 5.2.2. Reactivi utilizați..... | 49 |
| 5.2.3. Aparatură utilizată..... | 49 |
| 5.3. Metode..... | 49 |
| 5.3.1. Evaluarea gradului de măcinare. Determinarea modulului de finețe și a modulului de uniformitate (metodă standardizată STAS 90/1988)..... | 49 |
| 5.3.1.1. Modulul de finețe..... | 49 |
| 5.3.1.2. Modulul de uniformitate..... | 50 |
| 5.3.2. Determinarea conținutului de substanțe uscate (determinarea umidității, SR ISO 712/1999)..... | 50 |
| 5.3.3. Determinarea conținutului de cenușă (SR ISO 2171/2002)..... | 50 |
| 5.3.4. Determinarea conținutului total de proteine (Standard AACC 46-13)..... | 50 |
| 5.3.5. Determinarea conținutului de lipide..... | 50 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3.6. Determinarea conținutului de glucide | 51 |
| 5.3.7. Determinarea conținutului de fibre..... | 51 |
| 5.3.8. Extracția pigmentilor antocianici | 51 |
| 5.3.9. Determinarea conținutului total de antociani monomerici..... | 51 |
| 5.3.10. Conținutul de polifenoli totali | 52 |
| 5.3.11. Conținutul total de flavonoide | 52 |
| 5.3.12. Determinarea activității antioxidante..... | 53 |
| 5.3.13. Analiza cromatografică a antocianilor din făina de orez negru..... | 54 |
| 5.3.14. Separarea fracțiunilor proteice | 54 |
| 5.3.15. Evidențierea proteinelor prin gel-electroforeză (SDS-PAGE)..... | 54 |
| 5.3.16. Tratamentul termic | 55 |
| 5.3.17. Determinări spectroscopice..... | 55 |
| 5.3.18. Analiza statistică | 55 |
| 5.4. Rezultate și discuții | 55 |
| 5.4.1. Caracterizarea fizico-chimică a fracțiunilor din făină de orez negru | 55 |
| 5.4.2. Determinarea compușilor cu acțiune antioxidantă din fracțiunile de făină de orez negru | 57 |
| 5.4.2.1. Determinarea conținutului total de antociani monomerici | 57 |
| 5.4.2.2. Determinarea cantitativă a antocianilor utilizând HPLC..... | 58 |
| 5.4.2.3. Determinarea conținutului de polifenoli totali..... | 59 |
| 5.4.2.4. Determinarea conținutului total de flavonoide din făina de orez negru | 61 |
| 5.4.2.5. Determinarea activității antioxidante a făinii de orez negru | 61 |
| 5.4.3. Separarea și caracterizarea fracțiunilor proteice din făina de orez negru | 62 |
| 5.4.4. Efectul temperaturii asupra proteinelor din făina de orez negru..... | 64 |
| 5.4.4.1. Spectrele de emisie | 64 |
| 5.4.4.2. Spectre sincron de fluorescență | 66 |
| 5.4.4.3. Diagrama de fază | 68 |
| 5.4.4.4. Spectroscopie tridimensională de fluorescență | 69 |
| 5.4.4.5. Experimente de quenching | 72 |
| 5.5. Concluzii parțiale..... | 75 |
| Referințe bibliografice | 77 |
| 6. Caracteristicile principalilor compuși biologic activi din făina de orez negru | 82 |
| 6.1. Considerații generale | 82 |
| 6.2. Materiale și metode..... | 84 |
| 6.2.1. Materiale | 84 |
| 6.2.1.1. Reactivi utilizați..... | 84 |

| | |
|---|------------|
| 6.2.1.2. Aparatură utilizată..... | 84 |
| 6.2.2 Metode..... | 84 |
| 6.2.2.1. Tratamentul termic..... | 85 |
| 6.2.2.2. Cinetica de degradare a compușilor fenolici din orezul negru | 85 |
| 6.2.2.3. Determinări spectroscopice | 85 |
| 6.2.2.4. Analiza statistică..... | 86 |
| 6.3. Rezultate și discuții | 86 |
| 6.3.1. Studii privind degradarea termică a compușilor biologic activi din făina de orez negru | 86 |
| 6.3.1.1. Efectul tratamentului termic asupra conținutului de antociani din fracțiunile de făina de orez negru | 86 |
| 6.3.1.2. Efectul tratamentului termic asupra conținutului de polifenoli din fracțiunile din făina de orez | 96 |
| 6.3.1.3. Efectul tratamentului termic asupra conținutului de flavonoide din fracțiunile de făină de orez negru | 105 |
| 6.3.1.4. Efectul tratamentului termic asupra activității anitoxidante din fracțiunile de făină de orez negru | 114 |
| 6.3.2. Studiul influenței temperaturii și a pH-ului asupra compușilor biologic activi din făina de orez negru utilizând tehnice de spectroscopie de fluorescență..... | 123 |
| 6.3.2.1. Influența pH-ului asupra antocianilor din făina de orez negru..... | 123 |
| 6.3.2.2. Influența tratamentului termic asupra compușilor biologic activi din făina de orez negru..... | 132 |
| 6.4. Concluzii parțiale..... | 141 |
| Referințe bibliografice | 143 |
| 7. Obținerea unui produs funcțional destinat persoanelor cu intoleranțe alimentare | 148 |
| 7.1. Aspecte generale | 148 |
| 7.2. Materiale și metode..... | 151 |
| 7.2.1. Materiale | 151 |
| 7.2.2. Obținerea produsului funcțional destinat persoanelor cu intoleranțe alimentare | 152 |
| 7.2.3. Metode..... | 152 |
| 7.2.3.1. Digestia in vitro a biscuiților aperitiv | 152 |
| 7.2.3.2. Analiza senzorială | 153 |
| 7.2.3.3. Determinarea markerilor imunologici prin utilizarea metodei ELISA..... | 153 |
| 7.2.3.4. Determinare colorimetrică..... | 154 |
| 7.2.3.5. Determinări microbiologice | 154 |
| 7.3. Reprezentarea schematică a procesului tehnologic de obținere a produsului funcțional destinat persoanelor cu intoleranțe alimentare..... | 154 |
| 7.4. Caracteristicile ecologice a biscuiților aperitiv..... | 156 |

| | |
|---|------------|
| 7.5. Rezultate și discuții | 156 |
| 7.5.1. Caracterizarea fizico-chimică a biscuiților aperitiv | 156 |
| 7.5.2. Evoluția conținutului de compuși biologic activi pe perioada de depozitare | 157 |
| 7.5.3. Digestibilitate in vitro | 157 |
| 7.5.4. Testarea potențialului antigenic al biscuiților aperitiv | 158 |
| 7.5.5. Rezultatele determinării colorimetrice..... | 158 |
| 7.5.6. Analize microbiologice | 159 |
| 7.5.7. Analize senzoriale | 159 |
| 7.6. Concluzii parțiale..... | 162 |
| Referințe bibliografice | 163 |
| 8. Concluzii generale | 166 |
| 9. Contribuții personale și perspective de continuare a cercetărilor | 168 |
| 10. Diseminarea rezultatelor cercetărilor | 169 |
| ANEXA 1 | 175 |
| ANEXA 2 | 178 |

Introducere

"Un produs alimentar poate fi considerat ca fiind funcțional în cazul în care se demonstrează în mod satisfăcător că poate afecta în mod benefic una sau mai multe funcții țintă în organism, dincolo de efectele nutritive adecvate într-un mod care să fie relevant fie pentru starea de bine și de sănătate sau reducerea riscului unei boli" (Roberfroid Marcel B., 2000).

Un aliment funcțional poate fi o componentă sau un macronutrient dacă are efecte specifice fiziologice (de exemplu, carbohidrați sau acizi grași esențiali) sau un micronutrient dacă aportul este în cantitate mai mare față de recomandările zilnice. Acesta poate fi, de asemenea, o componentă alimentară, care, chiar dacă are o anumită valoare nutritivă, nu este esențială (de exemplu, unele oligozaharide) sau nu are nici o valoare nutritivă (de exemplu, microorganismele vii sau substanțe chimice din plante). Într-adevăr, dincolo de valoarea sa nutritivă (cerințe metabolice) și funcția de a oferi plăcere, o dietă ofera consumatorilor componente capabile atât pentru a modula funcțiile organismului, cât și pentru a reduce riscul unor boli.

Un produs alimentar poate fi considerat funcțional dacă utilizează oricare dintre aceste 5 abordări:

1) Eliminarea unei componente cunoscute de a provoca sau identifica un efect dăunător atunci când este consumată (de exemplu, o proteină alergenă).

2) Creșterea concentrației unui component prezent în mod natural în produsele alimentare la un punct la care va induce efecte anticipate (de exemplu, fortificație cu un micronutrient pentru a ajunge la un aport zilnic mai mare decât doza zilnică recomandată, dar compatibil cu liniile directoare dietetice pentru reducerea riscului de boală), sau creșterea concentrației unui component non-nutritiv la un nivel cunoscut pentru a produce un efect benefic.

3) Adăugarea unei componente care nu este în mod normal prezentă în majoritatea alimentelor și nu este un macronutrient sau un micronutrient pentru care s-au dovedit efectele benefice (de exemplu, antioxidanții sau prebioticele).

4) Înlocuirea unui component (de obicei un macronutrient, grăsimi, a cărui aport este în exces și constituie o cauză pentru efecte dăunătoare) de un alt component pentru care s-a dovedit prin cercetări medicale efectele benefice asupra sănătății.

5) Creșterea biodisponibilității sau stabilitatea unei componente cunoscute pentru a produce un efect funcțional sau pentru a reduce riscul de boală care poate fi dat de unele produselor alimentare.

Cu toate acestea, astfel de efecte benefice ale alimentelor funcționale trebuie fundamentate științific (Roberfroid Marcel B., 2000).

Mai multe studii au indicat o asociere între orezul negru și efectele benefice asupra sănătății care sunt atribuite conținutului ridicat de fibre și fitochimicale, cum ar fi tocoferoli, tocotrienoli, complexul de vitamine B, complexul de vitamine E, γ -orizanol și compuși fenolici.

Există, de asemenea, rapoarte științifice privind extractele de tărâțe de orez negru care demonstrează efectele benefice asupra sănătății. Principalii metaboliți secundari din orezul negru sunt antocianii, cianidin-3-O-glucozidul și peonidin-3-O-glucozidul, care sunt localizați în

pericarp și straturile aleuronice din boabe. Aportul de antociani din orezul negru a fost demonstrat că reduce hiperactivitatea trombocitelor, hiperglicemia și facilitează menținerea funcției plachetare optime. Orezul negru este bogat în fibre, minerale și câțiva aminoacizi importanți având și un conținut de proteine mult mai mare decât orezul alb.

Teza de doctorat intitulată "**Cercetări privind obținerea de produse funcționale destinate persoanelor cu intoleranțe alimentare**" a vizat studiul compușilor biologic activi din făina de orez negru, comportamentul acestor compuși la diferite valori de temperatură și pH și obținerea unui produs inovativ.

Scopul lucrării l-a reprezentat valorificarea cunoștințelor fundamentale cu privire la funcționalitatea făinii de orez negru în vederea dezvoltării unui produs cu valoare nutritivă adăugată destinat atât persoanelor cu intoleranță la gluten, cât și consumatorilor care doresc o alimentație sănătoasă.

În acest context, cercetările derulate pe parcursul studiilor de doctorat au avut următoarele obiective:

- Obținerea fracțiunilor de făină din orez negru prin măcinare și caracterizarea fizico-chimică a acestora;
- Extracția, identificarea și caracterizarea compușilor biologic activi din făina de orez negru;
- Studiul modificărilor structurale ale compușilor biologic activi la diferite valori de pH și temperatură;
- Obținerea și caracterizarea fizico-chimică, microbiologică și senzorială a unui produs funcțional destinat persoanelor cu intoleranță alimentară (biscuiți aperitiv aglutenici).

Teza de doctorat este structurată în două părți:

I. STUDIUL DOCUMENTAR, format din 4 capitole, prezintă date recente din literatura de specialitate privind conceptul de produs funcțional, caracterizarea nutrițională și fizico-chimică a orezului negru, profilul compușilor bioactivi din orezul negru (antociani, fenoli, flavoni) și metodele de indentificare a acestor compuși, precum și aspecte legate de intoleranța la gluten sau boala celiacă.

II. PARTEA EXPERIMENTALĂ, este structurată în 3 capitole cuprinzând investigații originale realizate pe parcursul cercetării doctorale, după cum urmează:

Capitolul 5, intitulat **Caracterizarea făinii de orez negru**, prezintă compoziția chimică și proprietățile fizice ale extractelor din fracțiunile de făină din orez, identificarea principalilor antociani existenți în făina de orez negru, evidențierea proteinelor prin gel-electroforeză și studiul fracțiunilor proteice utilizând spectroscopia de fluorescență. De asemenea, sunt prezentate rezultatele obținute în urma studiului privind efectul tratamentului termic asupra

fracțiunilor proteice, fiind identificate mecanismele de denaturare a acestora prin determinarea spectrelor de emisie, a diagramei de fază și a variației parametrului A, a anizotropiei de fluorescență și prin experimentele de quenching cu acrilamidă și KI.

Capitolul 6, intitulat **Caracteristicile principalilor compuși biologic activi din făina de orez negru**, prezintă rezultatele investigațiilor privind comportamentul compușilor biologic activi extrași din fracțiunile de făină din orez negru, cu referire la activitatea și stabilitatea acestora în diferite condiții de pH și temperatură. S-a studiat, de asemenea, cinetica de inactivare a antocianilor la tratament termic, mecanismele de inactivare fiind descrise cu ajutorul modelelor cinetice de ordinul I.

Capitolul 7, intitulat **Obținerea unui produs funcțional destinat persoanelor cu intoleranțe alimentare**, prezintă tehnologia dezvoltată pentru obținerea biscuiților aperitiv aglutenici pe bază de făină de orez negru, precum și caracteristicile fizico-chimice, microbiologice și senzoriale ale produsului finit.

Fiecare capitol din Partea experimentală este structurat într-o succesiune logică, după cum urmează: *Introducere*, în care se prezintă oportunitatea cercetărilor și obiectivele specifice studiului realizat; *Materiale și metode*, în care sunt descrise materialele, reactivii utilizați, dar și metodele de investigare, de analiză, de prelucrare și interpretare a datelor experimentale; *Rezultate și discuții*, în care sunt evidențiate rezultatele originale obținute, precum și raportarea acestora la datele existente în literatura de specialitate; *Concluzii parțiale și Referințe bibliografice*.

Capitolul 8, Concluzii generale prezintă principalele concluzii care au rezultat din experimentele ce au vizat obținerea unui produs funcțional destinat persoanelor cu intoleranțe alimentare, prin caracterizarea fizico-chimică a făinii din orez negru, a modificărilor structurale a compușilor biologic activi precum și identificarea fracțiunilor proteice.

Teza de doctorat cuprinde *195 de pagini*, unde sunt incluse *42 de tabele* și *97 de figuri*, studiul documentar reprezentând *20 %* iar partea experimentală *80 %*.

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

Doctoranda a fost implicată pe parcursul stagiului de doctorat în echipa de cercetare a proiectelor: PN-II-RU-TE-2014-4-0618 cu titlul "A bottom-up approach on the effects of food processing on the allergenic potential of food proteins" director de proiect, Prof.dr.ing. Iuliana Aprodu și PN-III-P2-2.1-BG-2016-0143 cu titlul „Soluții pentru măcinișul multicerealier”, director de proiect Prof.dr.ing. Iuliana Banu.

Teza a fost realizată sub coordonarea științifică a comisiei de îndrumare cu următoarea componență:

- Prof.dr.ing. Camelia Vizireanu – conducător doctorat;
- Prof.dr.ing. Gabriela-Elena Bahrin;
- Prof.dr.ing. Iuliana Banu;
- Prof.dr.ing. Iuliana Aprodu.

5. Caracterizarea făinei de orez negru

5.1. Considerații generale

Orezul (*Oryza sativa L.*), este o cereală cultivată în țările în curs de dezvoltare. Este folosit ca aliment de bază pentru mai mult de peste trei miliarde de oameni din Asia. Orezul reprezintă o sursă bogată de carbohidrați, conține o cantitate moderată de proteine și grăsimi și, de asemenea, este o sursă de vitamine B cum ar fi tiamina, riboflavina și niacina. Carbohidrații din orez sunt în principal reprezentați de amidon care este compus din amiloză și amilopectină. Proprietățile fizico-chimice și caracteristicile de gătit ale orezului depind de conținutul de amiloză. Există mai multe tipuri de orez în întreaga lume, care sunt clasificate în funcție de culoare cum ar fi orezul alb, orezul brun, orezul roșu, orezul negru, etc, orezul putând fi, de asemenea, clasificat ca fiind orez aromat și fin (nearomatic). În ultimii ani, a existat o tendință globală pentru utilizarea fitochimicalelor din resurse naturale, cum ar fi legumele, fructele, semințele oleaginoase și plantele aromatice, ca și antioxidanți și ingrediente funcționale.

5.2. Materiale si metode

Orezul negru a fost procurat din hipermarketul Kaufland din Galați (orez integral Gran Nero vidat 500 g, Scotti), fiind măcinat printr-o moară de laborator (Mlynek Laboratory JNY Tip WZ/2) obținându-se astfel un măciș care apoi a fost cernut succesiv printr-o serie de site cu dimensiunile ochiurilor de cernere descrescătoare după cum urmează: 650, 555, 315, 180, 125 și 90 μm , rezultând astfel șapte fracțiuni (F1-F7).

Investigațiile au urmărit:

- Determinarea modulului de finețe și uniformitate a făinei de orez negru
- Caracterizarea fizico-chimică a fracțiunilor din făină de orez negru
- Determinarea antocianilor monomerici din extractul din făină de orez negru
- Spectrele de emisie
- Spectrele sincron de fluorescență
- Diagrama de fază
- Spectroscopie tridimensională de fluorescență
- Experimente de quenching

5.4. Rezultate și discuții

5.4.1. Caracterizarea fizico-chimică a fracțiunilor din făină de orez negru

Conținutul de umiditate a fost de aproximativ 11% pentru toate fracțiunile de făină analizate. Valorile cenușii au fost semnificativ diferite între cele șapte fracțiuni. O tendință de creștere a fost observată odată cu scăderea dimensiunii particulelor. Prima fracțiune are cel mai scăzut conținut de cenușă $1,04 \pm 0,02 \text{ g}/100 \text{ g}$, în timp ce cea mai mare valoare a cenușii $4,66 \pm 0,20 \text{ g}/100 \text{ g}$ a fost găsită pentru fracția F7, (Tabelul 5.1). Aceste rezultate s-ar putea explica prin faptul că în ultimele fracțiuni s-au concentrat toți conjuzații ce se găsesc în straturile cariopsei.

Conținutul de grăsime a crescut în fracțiunile din făină de orez negru odată cu scăderea dimensiunii particulelor, înregistrându-se cel mai ridicat conținut pentru fracțiunea F5 ($6,27 \pm 0,16$

g/100 g), în timp ce pentru probele cu dimensiuni inferioare fracțiunii F5 conținutul de grăsime a fost mai redus (Tabelul 5.1).

Conținutul de proteine a crescut odată cu diminuarea dimensiunii particulelor, de la 9,80±0,12 g/100 g pentru F1 la 12,25±0,15 g/100 g pentru F7.

Tendința de creștere a conținutului de proteine de la prima fracțiune la cea de-a șaptea este posibilă datorită faptului că proteinele sunt mai concentrate în endosperm și se pare că se găsesc în ultima fracțiune în cea mai mare concentrație.

În fracțiunile de făină F4 și F5 s-au obținut cele mai mari concentrații de fibre, fiind de 3,33±0,69 % și, respectiv, de 3,56±1,17 %. Aceste rezultate oferă indicații cu privire la dispunerea preponderentă a fibrelor în stratul aleuronic al boabelor.

S-a observat o tendință de scădere a conținutului de carbohidrați de la 73,07±0,14 g/100 g în fracțiunea F1 până la 62,16±0,08 g/100 g în fracțiunea F7. Analizând rezultatele prezentate în Tabelul 5.1, se poate aprecia că, din punct de vedere procentual, carbohidrații reprezintă compuşii de bază din toate fracțiunile de orez negru investigate.

Tabelul 5.1. Compoziția fizico-chimică a fracțiunilor de făină din orezul negru

| Probe | Umiditate % | Cenușă g/100g | Lipide g/100g | Proteine g/100g | Fibre % | Carbohidrați g/100g |
|-------|-------------|---------------|---------------|-----------------|-----------|---------------------|
| F1 | 11,32±0,04 | 1,04±0,02 | 1,49±0,05 | 9,80±0,12 | 1,37±0,38 | 73,07±0,14 |
| F2 | 11,47±0,03 | 1,91±0,02 | 1,58±0,03 | 9,86±0,14 | 1,97±0,43 | 71,42±0,11 |
| F3 | 11,27±0,03 | 2,36±0,06 | 4,42±0,09 | 10,37±0,09 | 2,68±0,40 | 67,66±0,10 |
| F4 | 11,35±0,06 | 3,41±0,06 | 5,76±0,12 | 10,77±0,05 | 3,33±0,69 | 63,52±0,14 |
| F5 | 11,30±0,01 | 3,80±0,13 | 6,27±0,16 | 10,79±0,20 | 3,56±1,17 | 62,89±0,09 |
| F6 | 11,22±0,07 | 4,33±0,16 | 4,80±0,08 | 11,85±0,06 | 1,66±0,44 | 62,65±0,11 |
| F7 | 11,20±0,03 | 4,66±0,20 | 4,41±0,11 | 12,25±0,15 | 1,10±0,48 | 62,16±0,08 |

5.4.2. Determinarea compușilor cu acțiune antioxidantă din fracțiunile de făină din orez negru

5.4.2.1. Determinarea conținutului de antociani monomerici

În figura 5.4 se pot vedea rezultatele conținutului total de antociani. Pentru cuantificarea antocianilor a fost utilizată o metodă spectrofotometrică bazată pe măsurarea absorbției la două lungimi de undă diferite, 520 și 700 nm, a probelor la două valori de pH. Conținutul de antociani a fost exprimat în g echivalenți cianidin 3-glucozidici (C3G)/100g făină.

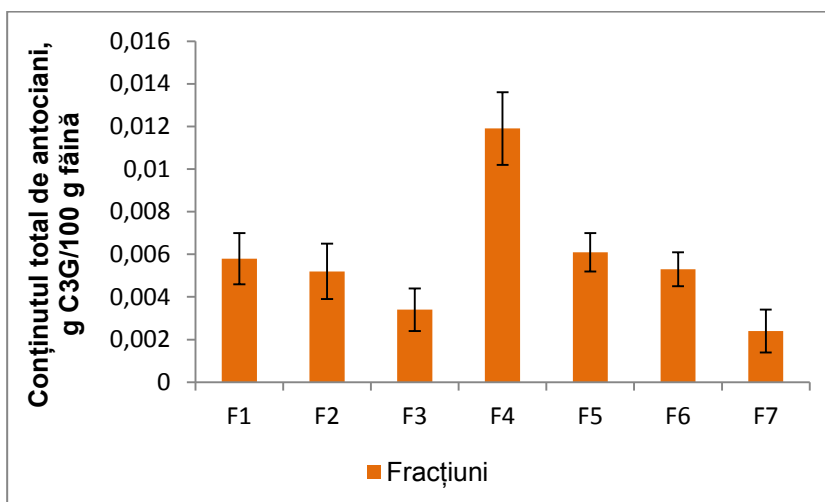


Figura 5.4. Conținutul total de antociani monomerici din fracțiunile de făină din orez negru

Antocianii sunt responsabili pentru pigmentarea în mov, roșu sau albastru a diferitelor părți ale plantelor. Cele mai importante diferențe dintre antociani sunt datorate naturii și numărului de zaharuri din structura moleculei de antocian, poziției unde acestea sunt atașate, numărului grupărilor hidroxil, precum și numărul nucleelor aromatice sau acizilor alifatici. Dintre cele șapte fracțiuni de făină din orez negru investigate, fracțiunea F4 a prezentat cea mai mare cantitate de antociani $0,0119 \pm 0,0017$ g C3G/100 g. Toate celelalte fracțiuni au prezentat valori apropiate: $0,0052 \pm 0,0013$ g C3G/100g, în cazul F2, $0,0053 \pm 0,0008$ g C3G/100 g pentru F6, $0,0058 \pm 0,0012$ g C3G/100 g pentru F1 și $0,0061 \pm 0,0009$ g C3G/100 g pentru F5, iar cele mai mici valori au fost înregistrate pentru fracțiunile F3 și F7 ($0,0034 \pm 0,001$ și respectiv $0,0024 \pm 0,001$ g C3G/100 g).

5.4.2.2. Determinarea cantitativă a antocianilor utilizând HPLC

Cromatograma HPLC din figura 5.5, în care se prezintă profilul antocianilor din făina integrală din orez negru (F) și fracțiunea F4, indică trei peak-uri asociate următorilor antociani: peak-ul 1 - compus neidentificat, peak-ul 2 - cianidin 3-glucozid ($0,211$ g/100 g pentru F și $0,338$ g /100 g pentru F4) și peak-ul 3 - peonidin-3-glucozid ($0,001$ g/100 g pentru F și $0,0051$ g/100 g pentru F4).

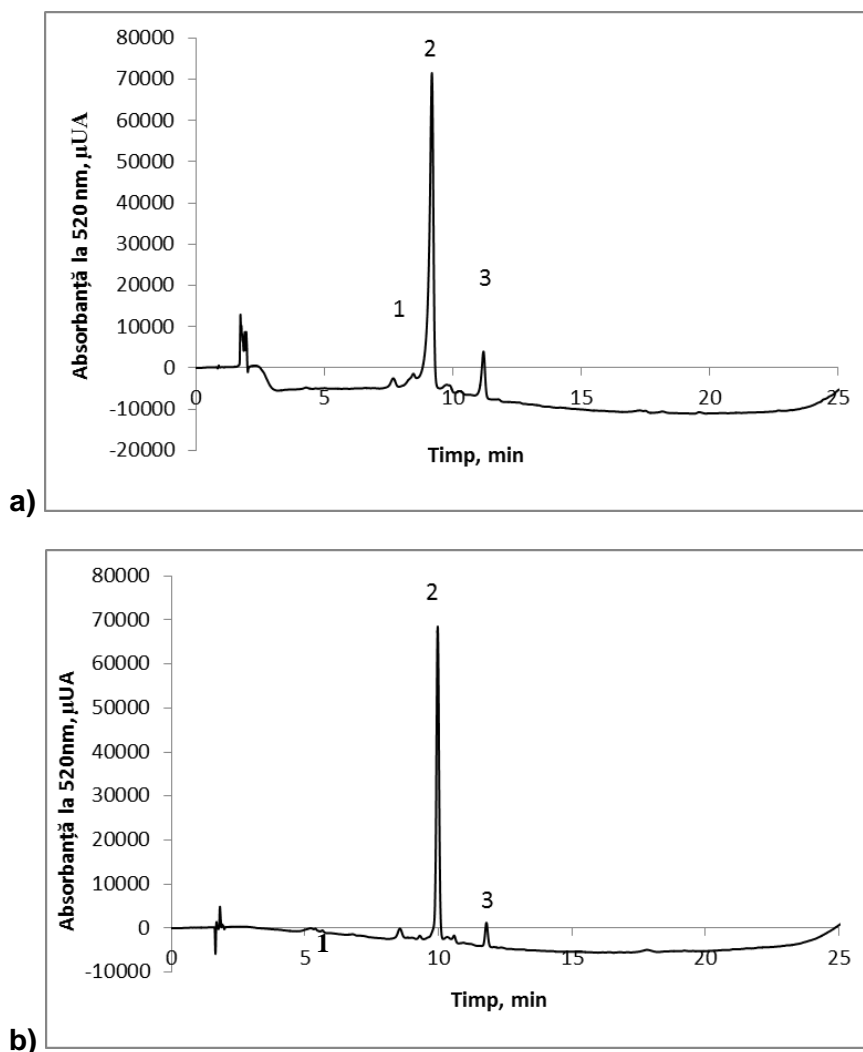


Figura 5.5. Profilul antocianilor în fracțiunea patru (a), și făina din orez negru (b) folosind HPLC. Peak-ul 1 - compus neidentificat; Peak-ul 2 - cianidin-3-glucozid; Peak-ul 3 - peonidin-3-glucozid

5.4.2.3. Determinarea conținutului de polifenoli totali

Conținutul total de polifenoli a fost determinat prin metoda Folin Ciocâlțeu modificată, și a fost exprimat în echivalenți g de acid galic (AG)/100 g făină.

Compușii fenolici (polifenolii) se găsesc în diferite categorii de produse alimentare, inclusiv fructe, legume, cereale, acești compuși variind de la o sursă la alta datorită unor factori genetici, de mediu și condițiilor de prelucrare. Orezul este un component important al dietei și are proprietăți antioxidante semnificative. Fenolii sunt compușii care contribuie la activitatea antioxidantă totală a produselor. În prezentul studiu s-a pus în evidență că fracțiunea F4 a avut cel mai mare conținut polifenolic de $48,30 \pm 0,53$ g AG/100 g făină, urmată îndeaproape de F3 cu un conținut de $43,23 \pm 0,73$ g AG/100 g făină, în timp ce F5 și F6 au aproape același conținut, de $40,22 \pm 0,80$ și respectiv $40,53 \pm 0,63$ g AG/100 g făină.

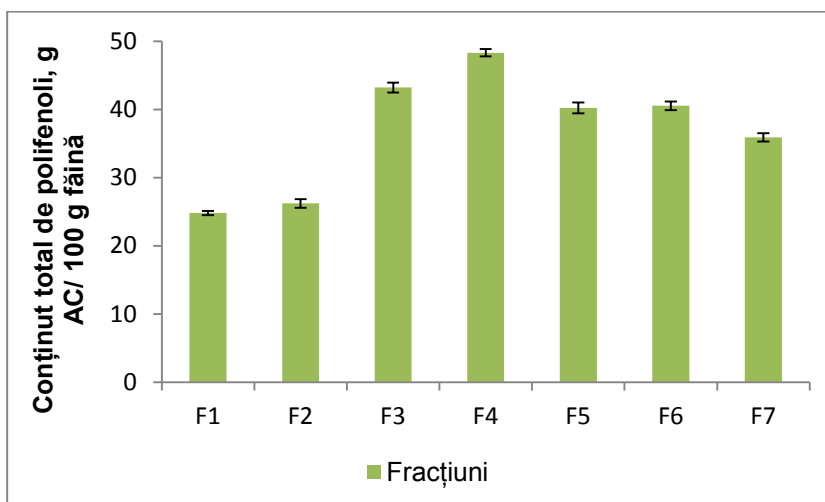


Figura 5.6. Conținutul total de polifenoli din fracțiunile de făină din orez negru

5.4.2.4. Determinarea conținutului total de flavonoide din făina de orez negru

Conținutul total de flavonoide din fracțiunile de făină din orez negru a fost determinat prin metoda spectrofotometrică folosind lungimea de undă de 765 nm și a fost exprimată ca echivalenți catechinici (g EC/100 g făină).

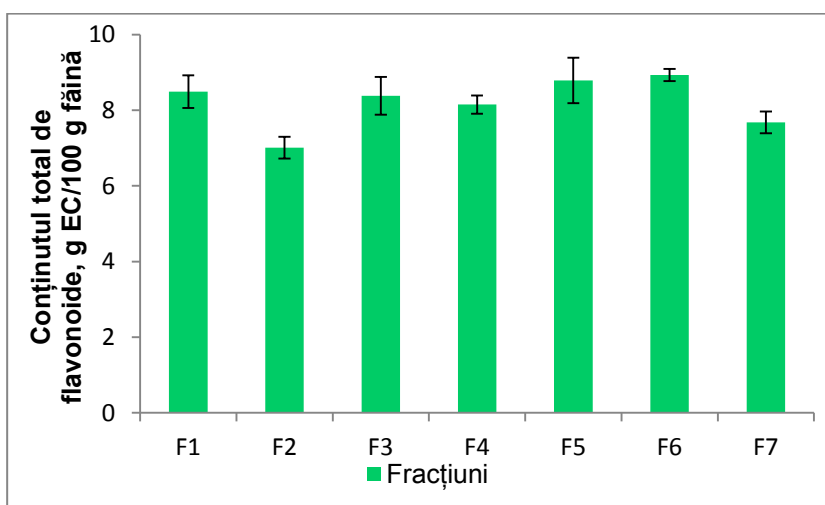


Figura 5.7. Conținutul total de flavonoide din fracțiunile de făină din orez negru

Se poate observa în figura 5.7, că conținutul de flavonoide pentru F1, F3-F6 are valori similare, ($8,154 \pm 0,241$ g EC/100 g făină F1, $8,383 \pm 5,09$ EC/100 g făină F3 și $8,931 \pm 0,169$ g făină EC/100 g F6), în timp ce F2 și F7 prezintă valori mai mici de $7,010 \pm 0,294$ și $7,682 \pm 0,291$ g de făină EC/100 g.

5.4.2.5. Determinarea activității antioxidante a făinii din orez negru

Mai mulți cercetători au raportat că antocianii, compușii flavonici și polifenolii prezintă activitatea antioxidantă. Activitatea antioxidantă a fracțiunilor de făină din orez negru a fost

exprimată ca procent de inhibiție (figura 5.8.). Activitatea antioxidantă pentru cele șapte fracțiuni a variat între $60 \pm 2,3\%$ (F1) – $68,23 \pm 4,01\%$ (F5). Având în vedere rezultatele prezentate anterior, se poate aprecia că activitatea antiradical DPPH se datorează în cea mai mare parte conținutului flavonoidic și conținutului de polifenoli totali dar și conținutului de antociani din fracțiunile de făină investigate.

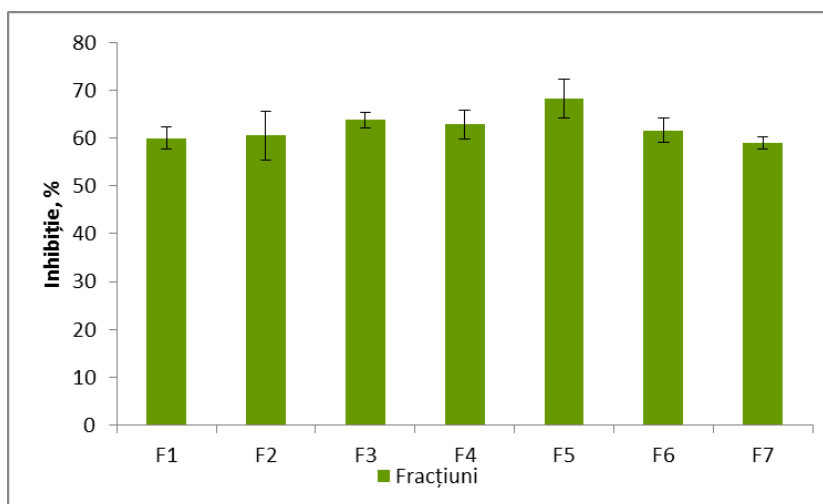


Figura 5.8. Activitatea antioxidantă a fracțiunilor de făină din orez negru

5.4.3. Separarea și caracterizarea fracțiunilor proteice de făina din orez negru

Fracțiunea de făină din orez cu cea mai mare concentrație de proteină a fost utilizată în continuare pentru separarea și identificarea principalelor fracțiuni proteice. Analizând rezultatele prezentate în Tabelul 5.1, se poate aprecia că proteinele s-au concentrat în cea mai mare parte în fracțiunea F7 cu particule de dimensiuni mai mici de 90 pm.

Rezultatele analizei electroforetice SDS-PAGE efectuată pentru a pune în evidență diferite fracțiuni proteice din făina de orez negru sunt prezentate în Figura 5.9.

Analizând rezultatele analizei SDS-PAGE prezentate în Figura 5.9, se vede că masele moleculare ale fracțiilor de albumină sunt distribuite în intervalul 13-16 kDa, 20-25 kDa și 35-50 kDa. Glutelinele au avut benzi în jurul regiunilor de 13-25 kDa și 35 kDa, în timp ce benzile de globulină au fost estimate să corespundă la 12-17 kDa, 20-27 kDa și 50-70 kDa. În final, profilul electroforetic al prolaminelor este caracterizat prin existența a două benzi intense în jurul valorilor 10 și 15 kDa (Figura 5.9).

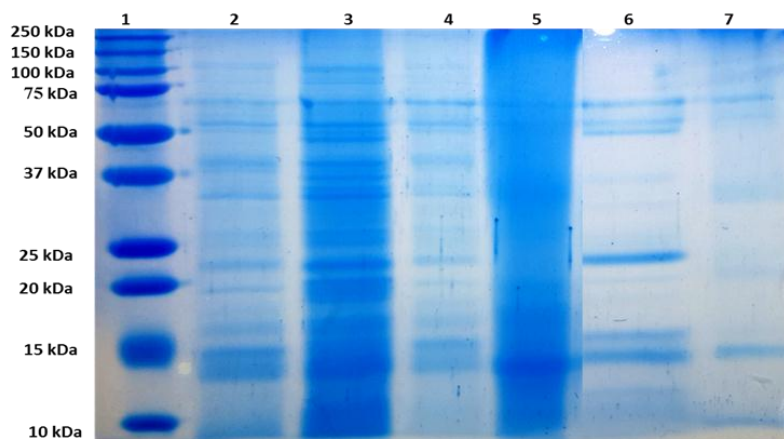


Figura 5.9. Rezultatul analizei SDS-PAGE (4,5% - 15%). Profilul proteinelor din făina de orez negru (F) (banda 2), fracțiunea F7 și din extractele efectuate pentru separarea albuminelor, glutelinelor, globulinelor și prolaminelor (benzile 3-7). Banda 1- Precision Plus Protein Dual Extra

5.4.4. Efectul temperaturii asupra proteinelor din făina de orez negru

5.4.4.1. Spectrele de emisie

Spectroscopia de fluorescență a fost utilizată pentru a observa modificările conformaționale sau procesele de pliere sau depliere, producând astfel reorientarea locală a resturilor de triptofan și tirozină găsite în fracțiunile de albumină, globulină și glutelină care au fost extrase din fracțiunea de făină din orez negru cu dimensiunea particulelor mai mică de 90 μm , și au fost supuse tratamentului termic. Lungimea de undă la excitație a fost de 292 nm pentru excitarea selectivă a triptofanului, 280 nm pentru excitarea triptofanului și tirozinei și 274 nm pentru selectarea selectivă a tirozinei. Spectrele de emisie obținute prin excitarea selectivă a resturilor de triptofan sunt prezentate în figura 5.10.c). Analizând spectrele de emisie se poate observa că valoarea maximă a intensității fluorescenței a fost obținută pentru fracțiunea de albumină, în timp ce intensitatea cea mai mică a fost înregistrată la fracțiunea de glutelină (360 nm-504,86 \pm 6,10 UA). Atunci când s-a realizat excitarea resturilor de triptofan și tirozină, valoarea λ_{max} corespunzătoare intensității maxime a fluorescenței a variat de la 357 nm pentru albumine, la 355 nm pentru globuline și 358,5 nm pentru gluteline. Când s-a realizat excitarea la lungimea de undă de 274 nm, extractele fracțiunilor de proteine obținute din făina de orez negru au prezentat diferite valori ale maximului de fluorescență, după cum urmează: la 382 nm (intensitatea fluorescenței de 339,07 UA) în cazul globulinelor, la 358 nm (intensitatea fluorescenței de 334,52 UA) pentru albumine și cea mai mică valoarea a intensității maxime a fluorescenței (303,9 UA) a fost înregistrată pentru gluteline la lungimea de undă de 360 nm.

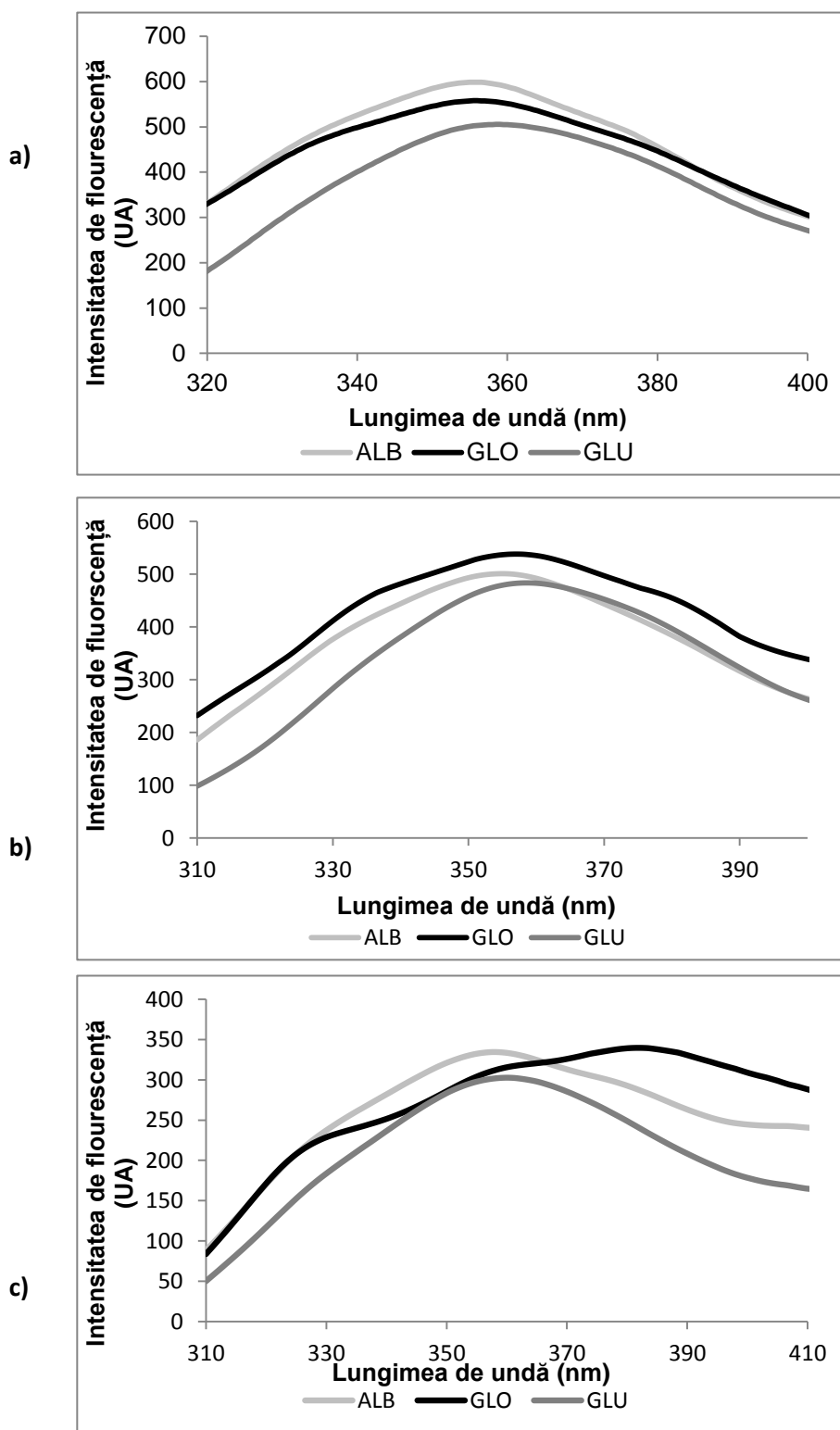


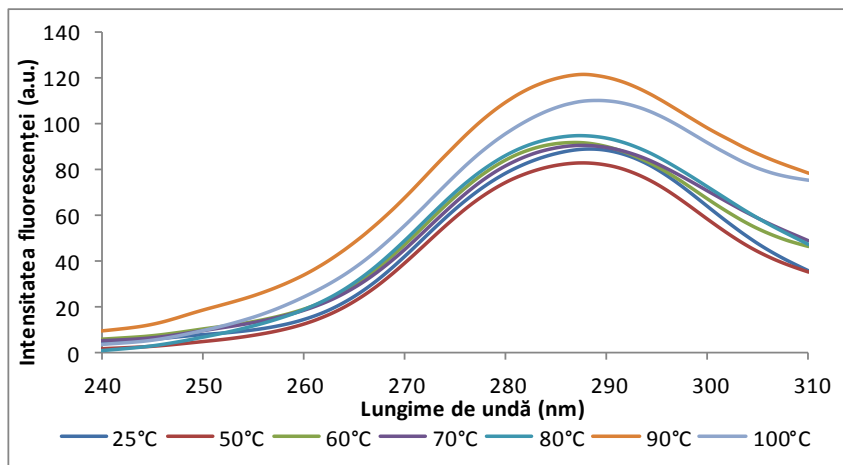
Figura 5.10. Spectrele de emisie ale proteinelor din orez negru la 25 °C. Lungimea de undă de excitație a fost 274 nm (a), 280 nm (b) și 292 nm (c) și spectrele au fost colectate între 310 și 420 nm.

5.4.4.2. Spectre sincron de fluorescență

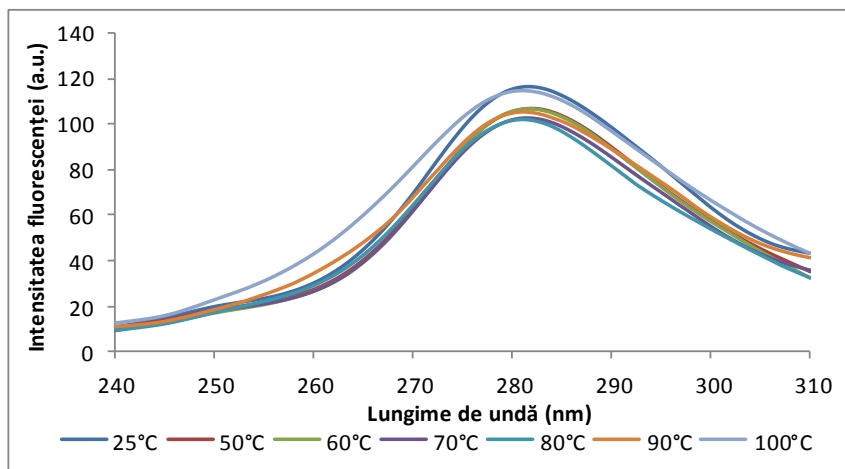
Spectroscopia sincron de fluorescență evidențiază resturile de triptofan la $\Delta\lambda$ 60 nm, iar resturile de tirozină la $\Delta\lambda$ 15 nm. În domeniul de temperatură testat spectrele sincron la $\Delta\lambda$ de

15 nm au indicat prezența unui red-shift al lungimii de undă maximă la emisie de 3 nm în cazul fracțiunii de ALB (de la 286 nm identificat la temperatura de 25°C la 289 nm la 100°C), și două blue-shifturi de 1 și 2 nm pentru fracțiunile de GLO (de la 282 nm identificat la temperatura de 25°C la 281 nm la 100°C) și respectiv GLU (de la 295 nm identificat la temperatura de 25°C la 293 nm la 100°C). Red-shiftul înregistrat în cazul tratamentului termic al albuminelor din orezul negru indică expunerea resturilor de tirozină la un micromediu polar ca o consecință a denaturării proteinelor. Pe de altă parte, blue-shifturile identificate în cazul glubulinelor și glutelinelor din făina de orez negru oferă indicații cu privire la blocarea resturilor de tirozină într-un micromediu nepolar, ca urmare a modificării structurii poteinelor la tratament termic.

a)



b)



c)

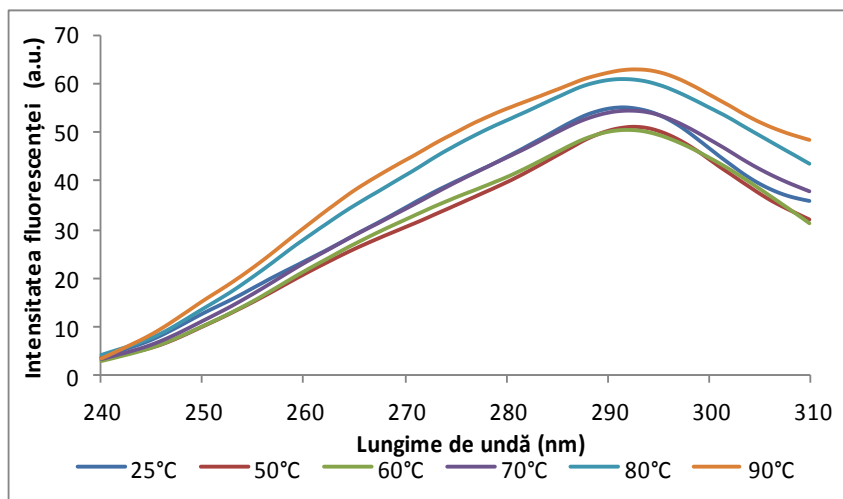
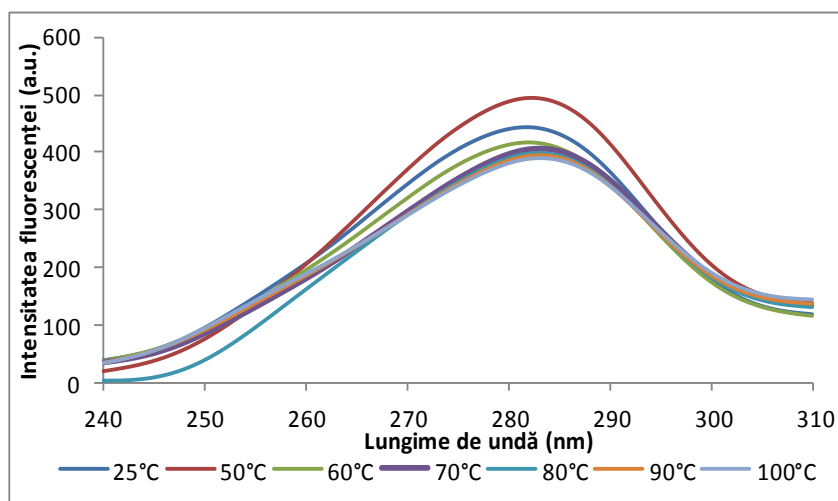


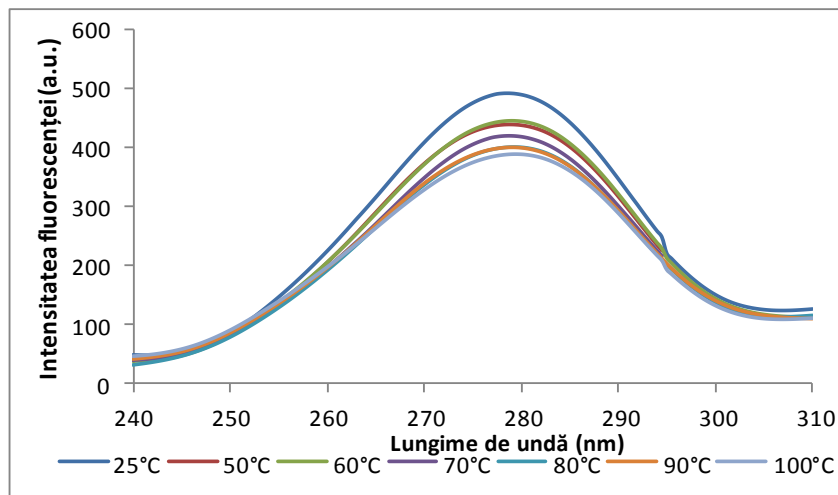
Figura 5.11. Spectrele sincrone de fluorescență ale proteinelor din făina de orez negru la $\Delta\lambda = 15$ nm la temperaturi diferite: (a) albumine, (b) globuline și (c) glutenine.

Spectrele sincrone la $\Delta\lambda$ de 60 nm au pus în evidență prezența unor red-shifturi la tratamentul termic până la 100°C al tuturor proteinelor investigate, indicând o expunere mai avansată a resturilor de triptofan la micromediul polar (solvent) raportat la proteinele native (măsurători efectuate la temperatura de 25°C). Astfel, red-shifturile indentificate au fost de la 282 la 283 nm în cazul fracțiunii de ALB, de la 278 la 280 nm în cazul fracțiunii de GLO, și de la 282 la 284 nm în cazul fracțiunii de GLU.

a)



b)



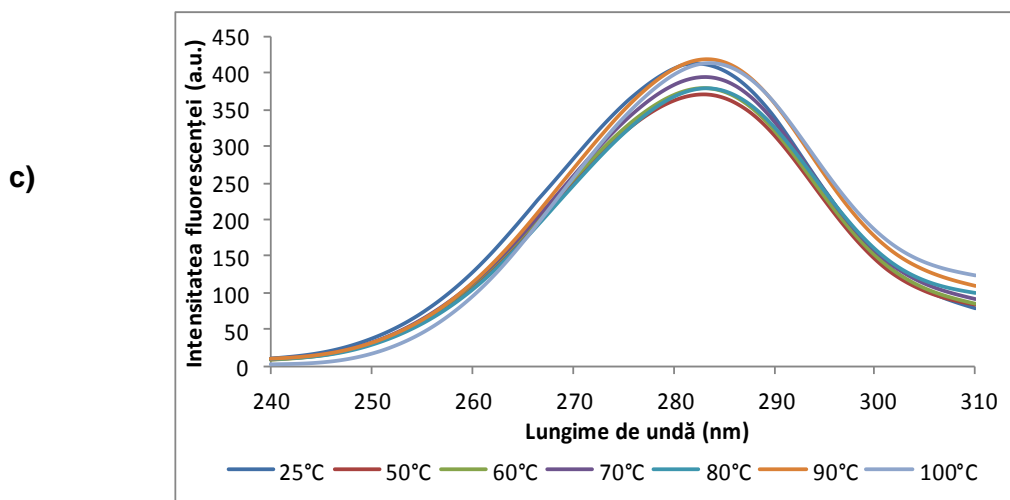


Figura 5.12. Spectrele de fluorescență sincrone ale proteinelor din făina de orez negru la $\Delta\lambda = 60$ nm la temperaturi diferite: (a) albumine, (b) globuline și (c) glutenine

5.4.4.3. Diagrama de fază

Diagrama de fază realizată pentru aprecierea modificărilor induse la nivelul structurilor proteinelor la tratament termic în domeniul de temperatură 25-100 °C (fig. 5.13) indică o corelație liniară în cazul GLO și GLU, sugerând prezența a două specii moleculare distincte probabil pliate și neexploatate. În cazul ALB s-a observat o corelație neliniară, indicând prezența a două sau mai multe specii moleculare distincte induse de încălzire. Pe baza rezultatelor prezentate în figura 5.13 se observă că, odată cu creșterea temperaturii apare o scădere secvențială a intensității fluorescenței. Se poate astfel aprecia că, în urma tratamentului termic s-au produs anumite modificări conformaționale, acestea fiind asociate cu distrugerea unor legături care stabilizează conformația proteinei.

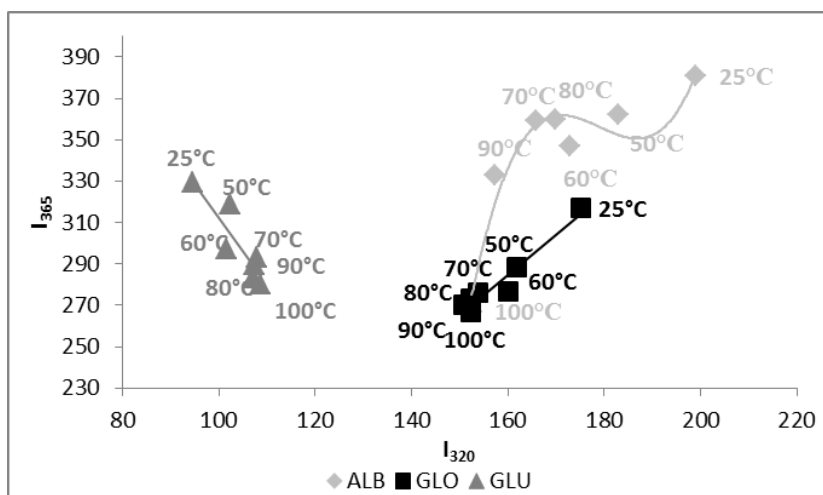


Figura 5.13. Diagrama de fază ce prezintă modificările conformaționale induse de căldură asupra proteinelor din orezul negru pe baza valorilor intensității fluorescenței intrinseci măsurate la lungimi de undă 320 și 365 nm. Valorile temperaturilor sunt indicate în vecinătatea simbolului corespunzător.

5.4.4.4. Spectroscopie tridimensională de fluorescență

Pentru a putea obține informații cât mai detaliate cu privire la modificările conformaționale ale proteinelor au fost realizate spectre tridimensionale ale fluorescenței care s-au bazat pe evaluarea modificărilor lungimii de undă la excitație sau la emisie corespunzătoare peak-ului fluorescenței și pe prezența sau dispariția peak-urilor. Modificările conformaționale ale celor trei fracțiuni proteice investigate ALB, GLO și GLU, produse în urma tratamentului termic sunt prezentate în figura 5.14, iar principalii parametri ce caracterizează spectrele sunt prezentați în tabelul 5.2.

Tabelul 5.2. Parametrii caracteristici ai spectrelor fluorescente tridimensionale ale albuminelor (a), globulinelor (b) și gluteninelor (c) la temperaturi diferite.

a)

| Temperatură °C | Peak 2 | | | Peak 1 | | |
|-------------------|---|---|---------------------------------------|---|---|---------------------------------------|
| | Poziție peak ($\lambda_{ex}/nm.$ λ_{em}/nm) | Stokes shift $\Delta\lambda$ (nm) | Intensitatea fluorescenței (UA) | Poziție peak ($\lambda_{ex}/nm.$ λ_{em}/nm) | Stokes shift $\Delta\lambda$ (nm) | Intensitatea fluorescenței (UA) |
| 25 | 230/354 | 124 | 449,93 | 280/356 | 76 | 505,36 |
| 50 | 230/354 | 124 | 429,04 | 280/356 | 76 | 470,82 |
| 60 | 230/354 | 124 | 426,91 | 280/356 | 76 | 465,78 |
| 70 | 230/358 | 128 | 340,79 | 280/358 | 78 | 424,75 |
| 80 | 230/356 | 126 | 397,69 | 280/357 | 77 | 461,14 |
| 90 | 230/358 | 128 | 399,36 | 280/357 | 77 | 448,35 |
| 100 | 230/360 | 13 | 387,35 | 280/358 | 78 | 439,64 |

b)

| Temperatură °C | Peak 2 | | | Peak 1 | | |
|-------------------|---|---|---------------------------------------|---|--------------------------------------|---------------------------------------|
| | Poziție peak ($\lambda_{ex}/nm.$ λ_{em}/nm) | Stokes shift $\Delta\lambda$ (nm) | Intensitatea fluorescenței (UA) | Poziție peak ($\lambda_{ex}/nm.$ λ_{em}/nm) | Stokes shift $\Delta\lambda$ (nm) | Intensitatea fluorescenței (UA) |
| 25 | 230/353 | 123 | 495,62 | 280/355 | 75 | 461 |
| 50 | 230/354 | 124 | 440,23 | 280/355 | 75 | 403,59 |
| 60 | 230/350 | 120 | 530,55 | 280/355 | 75 | 452,98 |
| 70 | 230/355 | 125 | 467,8 | 280/356 | 76 | 423,28 |
| 80 | 230/355 | 125 | 410,93 | 280/356 | 76 | 395,23 |
| 90 | 230/358 | 128 | 477,02 | 280/357 | 77 | 414,79 |
| 100 | 230/357 | 127 | 449,7 | 280/356 | 76 | 394,11 |

c)

| Temperatură °C | Peak 2 | | | Peak 1 | | |
|-------------------|--|---|---------------------------------------|--|---|---------------------------------------|
| | Poziție peak ($\lambda_{ex}/nm.$ λ_{em}/nm) | Stokes shift $\Delta\lambda$ (nm) | Intensitatea fluorescenței (UA) | Poziție peak ($\lambda_{ex}/nm.$ λ_{em}/nm) | Stokes shift $\Delta\lambda$ (nm) | Intensitatea fluorescenței (UA) |
| 25 | 230/361 | 131 | 442,19 | 280/359 | 79 | 636,25 |
| 50 | 230/361 | 131 | 390,05 | 280/361 | 81 | 588,58 |
| 60 | 230/361 | 131 | 344,66 | 280/360 | 80 | 539,09 |
| 70 | 230/361 | 131 | 345,38 | 280/361 | 81 | 537,93 |
| 80 | 230/369 | 139 | 382,66 | 280/363 | 83 | 567,7 |
| 90 | 230/366 | 136 | 455,68 | 280/362 | 82 | 624,22 |
| 100 | 230/376 | 146 | 494,66 | 280/362 | 82 | 358,91 |

În figura 5.14 a și 5.14 b se pot observa prezența a 4 peak-uri. Peak-ul A și B corespund difuziei Rayleigh ($\lambda_{ex}=\lambda_{em}$), peak-ul 1 corespunde caracteristicilor spectrale ale resturilor de triptofan în timp ce Peak-ul 2 relevă comportamentul spectral al structurii lanțului polipeptidic (structură backbone). Intensitatea fluorescenței peak-urilor 1 și 2 din fig. 5.14 a precum și cele 2 peak-uri din fig. 5.12 b au o valoare maximă la temperatura de 25 °C, înregistrând o scădere semnificativă la temperatura de 70 °C, fapt ce indică reorientări semnificative asociate cu plierea lanțului polipeptidic prin tratamentul termic asupra fracțiunii de albumină.

În cazul fracțiunii de gluteline pot apărea modificări conformaționale semnificative în structura proteinelor, acestea fiind asociate cu tratamentul termic. Se poate observa prezența a trei peak-uri: primele două peak-uri prezintă aceleași caracteristici spectrale ca și în cazul albuminelor și globulinelor (5.14 a și 5.14 b), în timp ce cel de-al treilea peak poate fi asociat cu prezența unei specii moleculare intermediare.

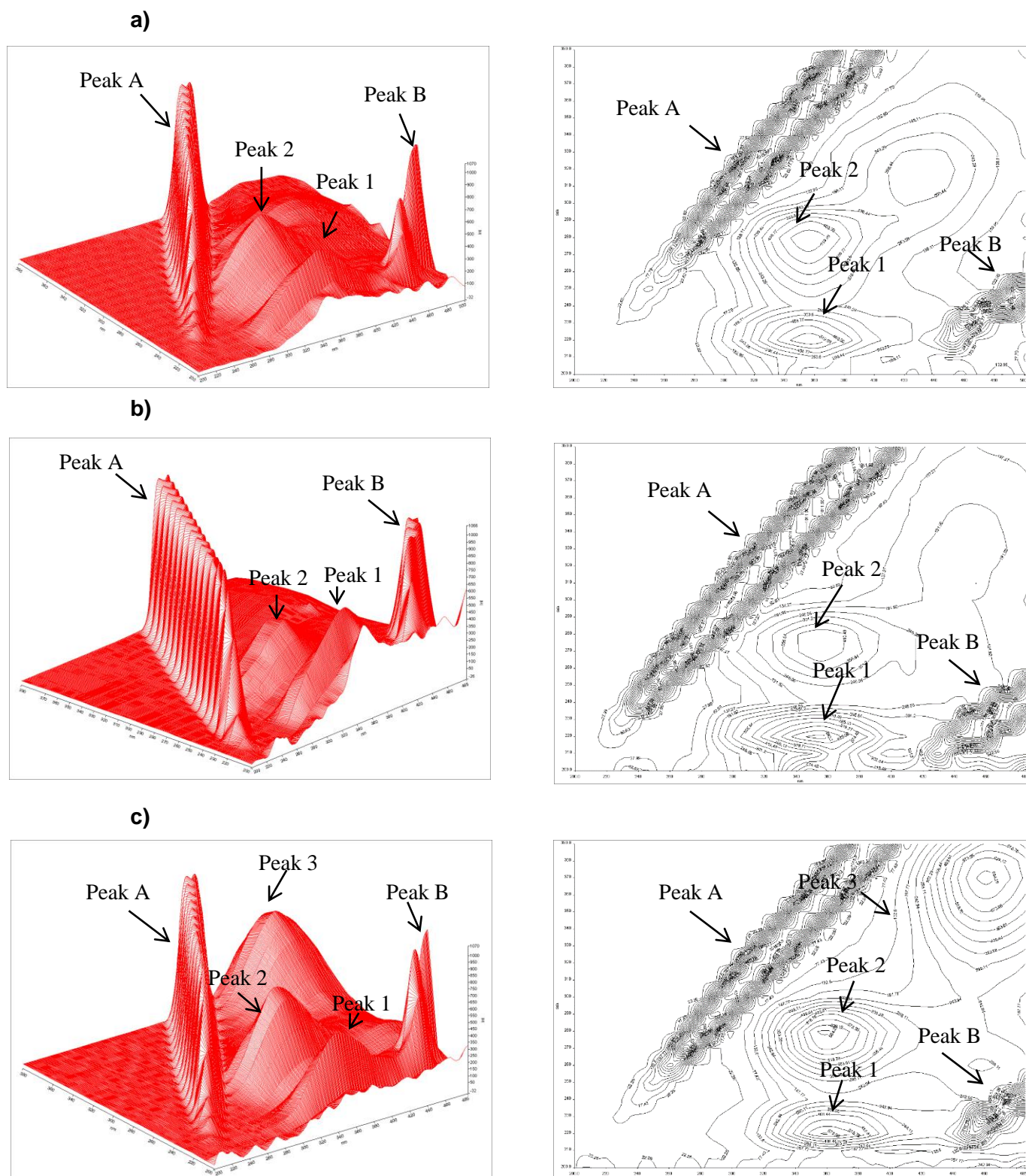


Figura 5.14. Spectrele tridimensionale ale fluorescenței și diagramele de contur ale proteinelor din orezul negru la temperatura de 25 °C: (a) albumine, (b) globuline și (c) gluteline.

5.4.4.5. Experimente de quenching

Au fost realizate experimente de quenching cu acrilamidă și KI pentru a verifica gradul de accesibilitate a acestor compuși la aminoacizii cu proprietăți fluorescente din structura proteinelor investigate. Această metodă pune în evidență impactul tratamentului termic asupra modificărilor structurale și conformației fracțiunilor de ALB, GLO și GLU obținute din extractele din făina de orez negru. Alegerea celor doi quencheri externi s-a făcut având în vedere proprietățile lor diferite în ceea ce privește accesibilitatea: acrilamida titrează resturile de triptofan expuse sau parțial expuse, în timp ce KI titrează exclusiv fluorescența resturilor de triptofan la suprafața sau în apropierea suprafeței moleculelor proteice.

Cele mai mari valori ale constantelor de quenching cu acrilamidă determinate pentru fracțiunile proteice din făina de orez negru au fost: pentru fracțiunea ALB tratată termic la temperatura de 60 °C ($15,11 \pm 3,32 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), pentru GLO la temperatura de 100 °C ($19,63 \pm 2,70 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), în timp ce pentru fracțiunea de GLU cea mai mare valoare a constantelor de quenching cu acrilamidă a fost înregistrată tot la temperatura de 100 °C ($14,15 \pm 1,67 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$).

Tabelul 5.3. Constanta de quenching Stern-Volmer (K_{SV}) cu acrilamidă la diferite temperaturi

| Temperatură °C | $K_{SV} (10^{-3} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$ | | |
|----------------|--|------------------|------------------|
| | Albumine | Globuline | Glutenine |
| 25 | $9,40 \pm 0,55$ | $18,07 \pm 1,79$ | $13,60 \pm 0,94$ |
| 50 | $11,72 \pm 0,47$ | $15,57 \pm 0,54$ | $8,55 \pm 0,68$ |
| 60 | $15,11 \pm 3,32$ | $19,41 \pm 0,06$ | $12,47 \pm 0,04$ |
| 70 | $13,79 \pm 1,11$ | $12,51 \pm 0,19$ | $13,25 \pm 0,46$ |
| 80 | $14,30 \pm 1,84$ | $12,22 \pm 1,96$ | $10,96 \pm 0,67$ |
| 90 | $13,75 \pm 2,84$ | $14,93 \pm 0,86$ | $13,79 \pm 1,77$ |
| 100 | $13,52 \pm 0,80$ | $19,63 \pm 2,70$ | $14,15 \pm 1,67$ |

Creșterea valorilor constantelor de quenching odată cu creșterea temperaturii indică faptul că tranziția conformațională a proteinelor scade distanța dintre resturile de triptofan și agentul de quenching. Creșterea valorilor K_{SV} la temperaturi mai ridicate reprezintă un indicator al rearanjărilor structurale și expunerii parțiale a resturilor de triptofan în moleculele proteinelor.

În experimentele de quenching cu KI, valoarea K_{SV} maximă pentru ALB a fost la temperatura de 100 °C ($6,47 \pm 0,53 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) iar valoarea minimă s-a înregistrat la temperatura de 80 °C ($4,70 \pm 0,57 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$). În cazul fracțiunii de GLO, K_{SV} maxim a fost la temperatura de 70 °C ($6,65 \pm 1,80 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) iar K_{SV} minim la 80 °C ($4,53 \pm 1,50 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), în timp ce valoarea cea mai mare pentru fracțiunea de GLU a fost înregistrată la temperatura de 90 °C ($4,38 \pm 1,15 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) iar cea mai mică valoare fiind la temperatura de 70 °C ($1,29 \pm 0,65 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$).

Independent de tratamentul termic aplicat, constantele de quenching cu acrilamidă au fost mai mari decât cele calculate cu KI, pentru toate fracțiunile proteice investigate (Tabelul 5.3. și Tabelul 5.4.).

Tabelul 5.4. Constanta de quenching Stern-Volmer cu KI la diferite temperaturi

| Temperatură °C | $K_{SV} (10^{-3} L \cdot mol^{-1})$ | | |
|----------------|-------------------------------------|-----------|-----------|
| | Albumine | Globuline | Glutenine |
| 25 | 4,92±0,87 | 7,03±1,17 | 1,37±0,42 |
| 50 | 5,04±0,79 | 6,56±0,21 | 2,37±0,11 |
| 60 | 5,65±1,01 | 5,10±0,95 | 1,99±0,51 |
| 70 | 5,79±1,41 | 6,65±1,80 | 1,29±0,65 |
| 80 | 4,70±0,57 | 4,53±1,50 | 1,81±0,32 |
| 90 | 6,41±1,00 | 5,43±2,26 | 4,38±1,15 |
| 100 | 6,47±0,53 | 6,21±1,10 | 3,12±0,91 |

5.5. Concluzii parțiale

- Făina obținută la nivel de laborator prin mărunțirea boabelor de orez negru prezintă granulație fină;
- În urma caracterizării fizico-chimice a fracțiunilor din făina de orez negru s-a putut constata faptul că fracțiunea cu cea mai mică dimensiune a particulelor, F7, are un conținut ridicat de proteine 12,25±0,15 g/100 g, în timp ce F5 are un conținut ridicat de fibre 3,56±1,17 %;
- Rezultatele obținute în urma caracterizării fizico-chimice indică faptul că proteinele sunt localizate în cea mai mare parte în endospermul bobului de orez, iar fibrele în stratul aleuronic;
- Făina de orez negru reprezintă o sursă bună de compuși fitochimici;
- Rezultatele au pus în evidență o gamă de compuși fitochimici prezenți în orezul negru. Au fost observate diferențe semnificative în ceea ce privește conținutul de antociani și acizi fenolici, și proprietățile antioxidante ale diferitelor fracțiuni din făina de orez negru;
- Dintre cele șapte fracțiuni de făină din orez negru investigate, F4 a prezentat cea mai mare cantitate de antociani 0,0119±0,0017 g C3G/100 g făină și de polifenoli 48,30±0,53 g AG/100 g făină;
- Nu au fost identificate diferențe semnificative în ceea ce privește conținutul de flavoni și activitatea antioxidantă a celor șapte fracțiuni de făină investigate;
- Activitatea antioxidantă a făinii din orez negru este în special dată de conținutul de flavonoide totale dar și de conținutul total de polifenoli și antociani;
- În făina din orez negru au fost identificați doi antociani și anume: cianidin-3-glucozidul (în cantitatea cea mai mare) și peonidin-3-glucozidul;
- Masele moleculare ale fracțiunii proteice de albumină au fost distribuite în intervalul de 13-25 kDa și 35-50 kDa. Glutelina a avut benzi în jurul valorii de 13 și 35 kDa în timp ce benzile de globuline au fost estimate a fi de 12-17 kDa, 20-27 kDa și 50-60 kDa. În cazul extractului de prolamină a fost evidențiate două benzi proeminente în jurul valorii de 10 și 13 kDa;
- Au fost efectuate experimente bazate pe măsurarea proprietăților fluorescente ale proteinelor pentru a putea observa modificările conformaționale sau procesele de pliere sau depliere proteică, ce determină modificarea micromediului resturilor de triptofan și tirozină;

- Măsurătorile de fluorescență intrinsecă au evidențiat faptul că tratamentul termic a determinat plierea parțială a moleculelor proteice la temperaturi moderate și deplierea la temperaturi mai ridicate, cu modificări în expunerea la solvent a resturilor de triptofan și tirozină;
- Diagrama de fază a prezentat o corelație liniară pentru fracțiunile de globulină și glutelină, în timp ce pentru fracțiunea de albumină a fost determinată o corelație neliniară, sugerând că încălzirea a condus la formarea a două sau mai multe specii moleculare distincte;
- Studiile de quenching au evidențiat o accesibilitate mai ridicată a acrilamidei la resturile de aminoacizi cu proprietăți fluorescente din fracțiunile globulinei decât KI. Pentru toate fracțiunile studiate valorile constantelor de quenching au variat cu temperatura la care s-a efectuat tratamentul termic, indicând caracterul secvențial al modificărilor structurale și conformaționale induse la nivelul proteinelor;
- Creșterea valorilor constantelor de quenching odată cu creșterea temperaturii indică faptul că tranziția conformațională a proteinelor scade distanța dintre resturile de triptofan și agentul de quenching. Creșterea valorilor K_{SV} la temperaturi mai ridicate reprezintă un indicator al rearanjărilor structurale ce determină expunerea parțială a resturilor de triptofan în moleculele proteinelor;
- Creșterea temperaturii a determinat scăderea secvențială a intensității fluorescenței, indicând faptul că, în urma tratamentului termic s-au produs anumite modificări conformaționale, acestea fiind asociate cu distrugerea unor legături care stabilizează conformația proteinei;
- Prezentul studiu furnizează noțiuni fundamentale cu privire la funcționalitatea fiziologică și comportamentul la procesare al diferitelor componente ale făinii din orez negru, putând contribui la promovarea mai eficientă a consumului de produse pe bază de orez negru, prin creșterea gradului de conștientizare a consumatorilor cu privire la beneficiile pentru sănătate ale boabelor.

6. Caracteristicile principalilor compuși biologic activi din făina de orez negru

6.1. Considerații generale

În ultimii ani, a devenit o provocare identificarea unor noi surse vegetale de pigmenți utilizați în industria alimentară, deoarece se dorește înlocuirea coloranților sintetici care prezintă avantaje în ceea ce privește stabilitatea crescută și prețul scăzut. Interesul științific pentru îmbunătățirea tehnicilor de separare și identificare a antocianilor din surse vegetale a crescut semnificativ, datorită potențialelor utilizări în calitate de coloranți naturali. Antocianii prezintă activitate biologică semnificativă, având proprietăți antioxidante remarcabile, ce joacă un rol vital în prevenirea bolilor neuronale, cardiovasculare, a unor anumite tipuri de neoplasm, diabet, etc. (Kong și colab., 2003, Konczak și Zhang, 2004, Lule și Xia, 2005).

6.2. Materiale și metode

Experimentele au presupus utilizarea următorilor reactivi: soluție HCl 1N, soluție tampon fosfat pH=4,0, soluție de etanol 70 %, metanol de puritate HPLC, soluție de NaNO₂ 5 % (m/v), soluție de AlCl₃ 10 % (m/v), soluție de NaOH 1M, reactiv Folin-Ciocalteu, soluție Na₂CO₃ 20 % (m/v), soluție de KCl 0,025 M, pH=1.0, soluție de CH₃COONa·3H₂O 0,4 M, pH=4, soluție de acid formic 3 – 5 %, reactiv DPPH (2,2-difenil-1picrilhidrazil), soluție TROLOX, soluție acid galic, acid boric, 4%.

Echipamentele de laborator utilizate pentru efectuarea experimentelor au fost: incintă de termostatare cu apă Raypa TRADE BBA-4, Spania, 2007, balanță analitică de înaltă precizie, XS 403 SM, METTLER TOLEDO, Elveția, ultracentrifugă cu răcire, HETTICH Universal 320 R, Germania, pH – metru S 20 K, METTLER TOLEDO, Elveția, spectrometru de luminiscentă LS-55 (PerkinElmer Life Sciences, Shelton, CT, USA), shaker orbital cu control analogic al frecvenței de agitare și termostatare, LAB COMPANION COMECTA S.A., spectrofotometru UV-VIS cu dublu fascicol cu software de analiză a datelor, JENWAY.

Investigațiile din acest capitol au urmărit:

- Studii privind degradarea termică a compușilor biologic activi din făina de orez negru:
 - Efectul tratamentului termic asupra conținutului de antociani din fracțiunile de făină din orez negru
 - Efectul tratamentului termic asupra conținutului de polifenoli totali din fracțiunile de făină din orez negru
 - Efectul tratamentului termic asupra conținutului de flavonoide din fracțiunile de făină din orez negru
 - Efectul tratamentului termic asupra activității antioxidante a fracțiunilor de făină din orez negru
- Studiul influenței temperaturii și a pH-ului asupra compușilor biologic activi din făina de orez negru utilizând tehnici de spectroscopie de fluorescență
 - Influența pH-ului asupra antocianilor din făina de orez negru
 - Influența tratamentului termic asupra compușilor biologic activi din făina de orez negru

6.3. Rezultate și discuții

6.3.1. Studii privind degradare termică a compușilor biologic activi din făina de orez negru

6.3.1.1. Efectul tratamentului termic asupra conținutului de antociani din fracțiunile de făină din orez negru

S-a analizat gradul de degradare a conținutului de antociani din cele șapte fracțiuni din făină de orez negru într-un interval de temperatură de 60-100 °C, timp de 5 până la 20 de minute.

În figura 6.1 sunt prezentate rezultatele dependenței de temperatură a constantelor vitezelor de degradare termică a antocianilor din cele 7 fracțiuni din făina de orez negru în intervalul de temperatură 25–100 °C. Independent de dimensiunea particulelor din cele șapte fracțiuni din făina de orez negru investigate, cinetica de degradare în urma tratamentului termic aplicat este de ordinul I (Figura 6.1).

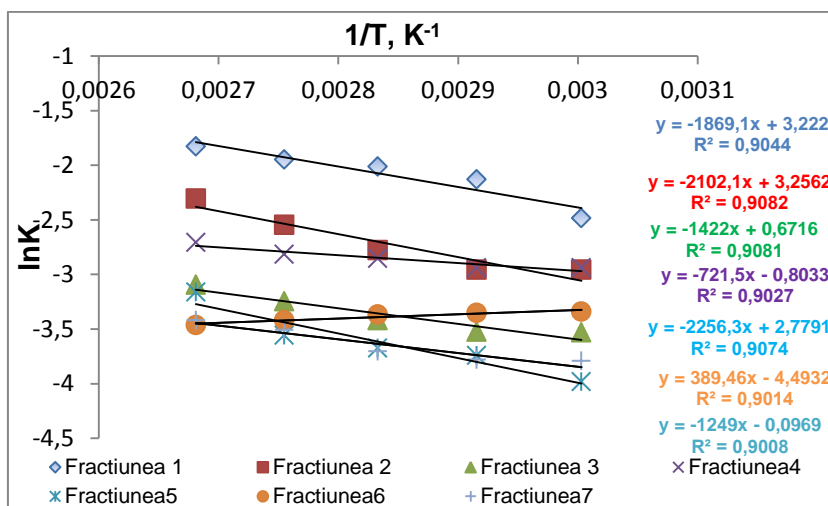


Figura 6.1. Dependența de temperatură a constantelor vitezelor de degradare termică a antocianilor din cele 7 fracțiuni din făina de orez negru

În figura 6.2 este prezentată degradarea termică a extractului din fracțiunea 1 din făina de orez negru în domeniul de temperatură 60-100 °C, remarcându-se faptul că urmează o cinetică de degradare de ordinul I.

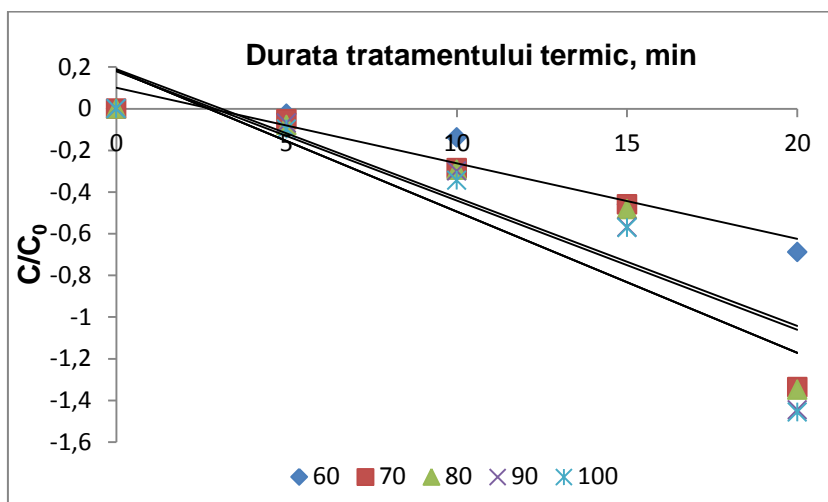


Figura 6.2. Cinetica de degradare termică a antocianilor din extractul obținut din fracțiunea 1 din făina de orez negru la diferite temperaturi (C este concentrația extractului la timpul t, C₀ este concentrația inițială a extractului)

Analizând rezultatele din tabelul 6.2 se poate observa că valoarea constantei de degradare k crește odată cu creșterea temperaturii, de la $0,174 \text{ min}^{-1}$ la temperatura de 25°C până la $0,203 \text{ min}^{-1}$ la temperatura de 80°C , după care valoarea lui k scade ($0,184 \text{ min}^{-1}$ la 100°C), în timp ce valoarea timpului de reducere zecimală (D) scade odată cu creșterea temperaturii până la 80°C .

Degradarea compușilor antocianici din fracțiunea 1 s-a caracterizat printr-o energie de activare de $0,25 \pm 2,60 \text{ kJ/mol}$, ceea ce înseamnă că pentru degradarea totală a conținutului de compuși antocianici este necesară o temperatură mai ridicată.

Tabelul 6.2. Parametrii cinetici estimați pentru conținutul de antociani monomerici totali (constantele de degradare k , D și energiile de activare- E_a) pentru fracțiunea 1 din făina de orez negru

| Temperatură, °C | D , min | k , min^{-1} |
|-----------------|--------------------|-------------------------|
| 60 | $13,21 \pm 2,71^*$ | $0,174 \pm 0,010$ |
| 70 | $11,27 \pm 1,42$ | $0,204 \pm 0,042$ |
| 80 | $11,29 \pm 1,21$ | $0,203 \pm 0,012$ |
| 90 | $12,43 \pm 1,00$ | $0,185 \pm 0,031$ |
| 100 | $12,5 \pm 1,01$ | $0,184 \pm 0,021$ |
| E_a , kJ/mol | $0,25 \pm 2,60$ | |

*abaterea medie pătratică

În figura 6.3 este prezentat comportamentul extractului rezultat din fracțiunea 2 din făina de orez negru, tratat termic la temperaturi cuprinse între 60°C și 100°C . Se poate observa faptul că degradarea compușilor antocianici din această fracțiune urmează o cinetică ordinul I, conținutul total de antociani din această fracțiune scăzând de la valoarea $0,052 \pm 0,013 \text{ C}_3\text{G mg/g}$ la valoarea de $0,001 \pm 0,000 \text{ C}_3\text{G mg/g}$, odată cu creșterea temperaturii.

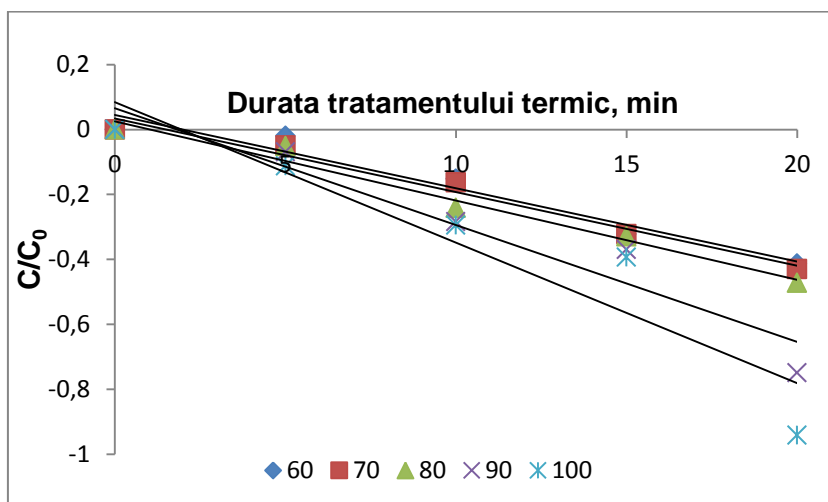


Figura 6.3. Cinetica de degradare termică a antocianilor din extractul obținut din fracțiunea 2 din făina de orez negru la diferite temperaturi (C este concentrația extractului la timpul t , C_0 este concentrația inițială a extractului)

După cum se observă din tabelul 6.3, parametrii cinetici k și D pentru conținutul antocianilor monomerici totali din fracțiunea 2 variază în funcție de tratamentul termic aplicat. În cazul constantei de degradare k , se poate observa o creștere a valorii acesteia în domeniul de temperatură de 90-100 °C. La temperatura de 100 °C constanta de degradare k înregistrează cea mai mare valoare și anume $0,171 \pm 0,022$, min^{-1} . În ceea ce privește constanta de degradare D , în cazul acesteia reiese faptul că are loc o creștere a valorii între temperaturile 60-80 °C aplicate. Astfel, la temperatura de 60 °C constanta D este $21,14 \pm 1,02$ min, și crește până la $24,21 \pm 3,00$ la temperatura de 70 °C. La temperatura de 80 °C valoarea constantei de degradare D este de $23,58 \pm 1,09$ min, scăzând apoi până la $13,45 \pm 1,01$ min, la temperatura de 100 °C.

Fracțiunea 2 din făina de orez negru înregistrează o energie de activare de $4,69 \pm 5,93$ kJ/mol.

Tabelul 6.3. Parametrii cinetici estimați pentru conținutul de antociani monomerici totali (constantele de degradare- k , D și energiile de activare- E_a) pentru fracțiunea 2 din făina de orez negru

| Temperatură, °C | D , min | k , min^{-1} |
|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| 60 | $21,14 \pm 1,02$ * | $0,108 \pm 0,037$ |
| 70 | $24,21 \pm 3,00$ | $0,095 \pm 0,017$ |
| 80 | $23,58 \pm 1,09$ | $0,097 \pm 0,028$ |
| 90 | $18,48 \pm 2,23$ | $0,124 \pm 0,017$ |
| 100 | $13,45 \pm 1,01$ | $0,171 \pm 0,022$ |
| E_a, kJ/mol | $4,69 \pm 5,93$ | |

*abaterea medie pătratică

Ca și în cazul primelor două fracțiuni investigate, studiul activității compușilor antocianici din fracțiunea 3 din făina de orez negru, în domeniul de temperatură 60 °C – 100 °C, indică faptul că degradarea acestor compuși urmează o cinetică de ordinul întâi. În urma tratamentului termic, conținutul de antociani din fracțiunea 3 descrește de la valoarea de $0,034 \pm 0,011$ C_3G mg/g la valoarea de $0,010 \pm 0,002$ C_3G mg/g.

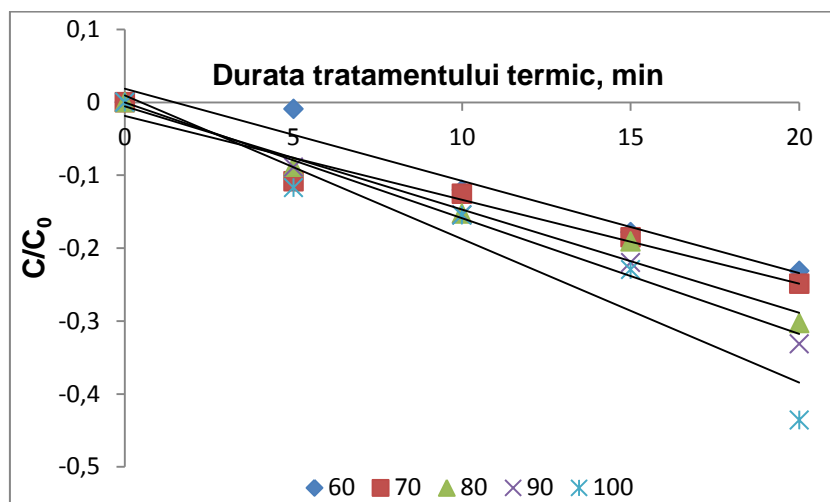


Figura 6.4. Cinetica de degradare termică a antocianilor din extractul obținut din fracțiunea 3 din făina de orez negru la diferite temperaturi (C este concentrația extractului la timpul t, C₀ este concentrația inițială a extractului)

Tabelul 6.4 pune în evidență constantele de degradare cinetică k și D ale căror valori variază în funcție de domeniul de temperatură considerat în analiză.

Astfel, valoarea constantei de degradare cinetică k crește de la 0,037 la 0,055 min⁻¹ odată cu creșterea temperaturii în intervalul 60°C la 90°C. Creșterea ulterioară a temperaturii până la 100°C nu a condus la modificarea valorii k (Tabelul 6.4.).

Pe de altă parte, timpul de reducere zecimală D descrește gradual în tot domeniul de temperatură aplicat fracțiunii 3. Reduceri semnificative ale valorilor D se remarcă în intervalul de temperature 60-90°C. Astfel, valoarea lui D se reduce gradual de la 61,34±7,05 min, corespunzând temperaturii de 60°C, la 54,05±7,00 (min) și apoi la 48,78±7,02 (min) la creșterea cu fiecare 10°C a temperaturii. Nu au fost remarcate diferențe semnificative între valorile D estimate la temperatura de 90°C (41,15 ±4,01 min) și 100°C (41,84±4,00 min).

Energia de activare calculată pentru extractul obținut din fracțiunea 3 a înregistrat o valoare de 10,77±1,06 kJ/mol, ușor inferioară celei din fracțiunea 2 și mult mai mare față de valoarea corespunzătoare fracțiunii 1, ce prezintă așadar o mai bună termostabilitate.

Tabelul 6.4. Parametrii cinetici estimați pentru conținutul de antociani monomerici totali (constantele de degradare- k , D și energiile de activare- E_a) pentru fracțiunea 3 din făina de orez negru

| Temperatură, °C | D , min | k , min ⁻¹ |
|-----------------|-------------|-------------------------|
| 60 | 61,34±7,05* | 0,037±0,011 |
| 70 | 54,05±7,00 | 0,042±0,021 |
| 80 | 48,78±7,02 | 0,047±0,012 |
| 90 | 41,15±4,01 | 0,055±0,021 |
| 100 | 41,84±4,00 | 0,055±0,024 |
| E_a , kJ/mol | 10,77±1,53 | |

*abaterea medie pătratică

Cinetica de degradare termică a extractului rezultat din fracțiunea 4 din făina de orez negru la diferite temperaturi este una de ordinul I. Concentrația de antociani din fracțiunea 4 rezultată prin mărunțirea și cernerea făinii de orez negru scade de la 0,119±0,017 C₃G mg/g la 0,017±0,001 C₃G mg/g odată cu creșterea temperaturii (Tabelul 6.1.).

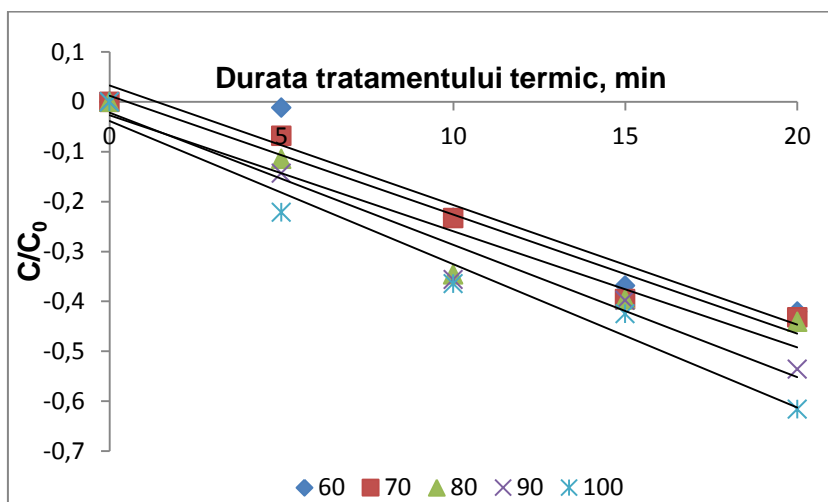


Figura 6.5. Cinetica de degradare termică a antocianilor din extractul obținut din fracțiunea 4 din făina de orez negru la diferite temperaturi (C este concentrația extractului la timpul t, C₀ este concentrația inițială a extractului)

Constantele de degradare termică (k) și timpul de reducere zecimală (D) estimate pentru antocianii din fracțiunea 4 sunt prezentate în Tabelul 6.5.

La temperatura de 80 °C valoarea constantei de degradare k, crește de la valoarea de 0,074±0,011 (min⁻¹), la valoarea de 0,081±0,023 (min⁻¹) la temperatura de 90 °C.

În intervalul de temperatură de 60-70 °C, timpul de reducere zecimală D crește de la valoarea de 27,10±7,00 min, la valoarea de 30,39±2,00 min. Între 80-90°C valoarea timpului de reducere zecimală D scade de la valoarea de 30,95±7,01 min, la valoarea de 28,16±2,31 min.

Analizând valoarea energiei de activare (1,09±0,02 kJ/mol) se poate aprecia că antocianii din fracțiunea 4 din făina de orez negru prezintă stabilitate mai bună la tratament termic comparative cu compușii concentrați în fracțiunile 2 și 3 (Tabelele 6.3 și 6.4.).

Tabelul 6.5. Parametrii cinetici estimați pentru conținutul de antociani monomerici totali (constantele de degradare- k, D și energiile de activare-Ea) pentru fracțiunea 4 din făina de orez negru

| Temperatură, °C | D, min | k, min ⁻¹ |
|-------------------|------------------|----------------------|
| 60 | 27,10±7,00* | 0,084±0,019 |
| 70 | 30,39±2,00 | 0,075±0,014 |
| 80 | 30,95±7,01 | 0,074±0,011 |
| 90 | 28,16±2,31 | 0,081±0,023 |
| 100 | 26,52±2,11 | 0,086±0,033 |
| Ea, kJ/mol | 1,09±2,50 | |

*abaterea medie pătratică

Se poate observa din figura 6.6 că, pentru fracțiunea din făina de orez negru cinetica de degradare în urma tratamentului termic aplicat este de ordinul I, iar conținutul de antociani din fracțiunea 5 scade de la o valoare de 0,061±0,021 C₃G mg/g la o valoare de 0,016±0,011 C₃G mg/g.

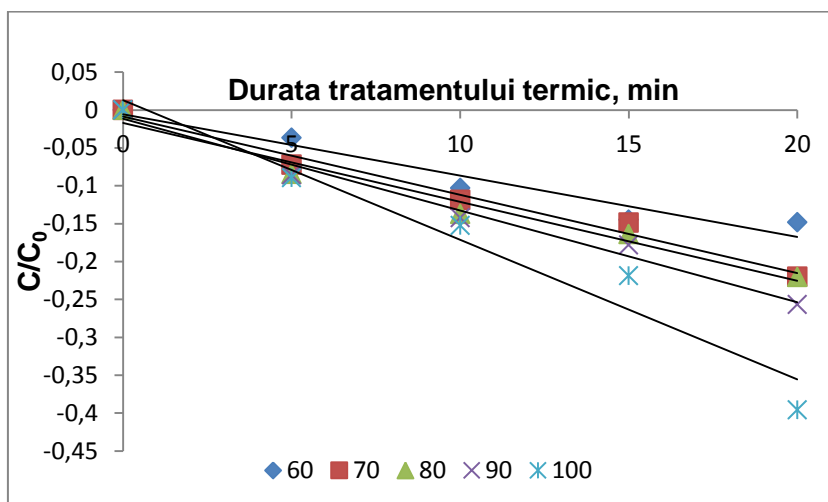


Figura 6.6. Cinetica de degradare termică a antocianilor din extractul obținut din fracțiunea 5 din făina de orez negru la diferite temperaturi (C este concentrația extractului la timpul t, C₀ este concentrația inițială a extractului)

Rezultate prezentate în tabelul 6.6 demonstrează faptul că în cazul conținutului de antociani monomerici totali a fracțiunii 5, se remarcă o tendință crescătoare a valorilor constantei de degradare k în domeniul de temperatură testat, în timp ce valorile constantei de degradare D descresc. La temperatura de 60 °C, constanta k are o valoare de $0,014 \pm 0,009 \text{ min}^{-1}$, iar la temperatura de 70 °C valoarea lui k este de $0,133 \pm 0,045 \text{ min}^{-1}$. Valoarea constantei de degradare k la 80 °C este $0,132 \pm 0,026 \text{ min}^{-1}$, valoare care crește la temperatura de 90 °C la $0,136 \pm 0,028 \text{ min}^{-1}$. La temperatura de 100 °C valoarea constantei k crește la valoarea de $0,150 \pm 0,012 \text{ min}^{-1}$.

Între 60-70 °C, valoarea constantei de degradare D scade de la valoarea de $16,51 \pm 7,09$ min, la valoarea de $17,24 \pm 7,32$ min. La temperaturile 80-90 °C, valoarea constantei D scade de asemenea de la valoarea $17,33 \pm 7,32$ min, la valoarea de $16,83 \pm 4,02$ min. Valoarea parametrului de degradare cinetică D la 100°C scade la valoarea de $15,31 \pm 2,43$ min.

În cazul extractului obținut din fracțiunea 5 valoarea energiei de activare este de $10,18 \pm 5,89 \text{ kJ/mol}$.

Tabelul 6.6. Parametrii cinetici estimați pentru conținutul de antociani monomerici totali (constantele de degradare- k , D și energiile de activare- E_a) pentru fracțiunea 5 din făina de orez negru

| Temperatură, °C | D , min | k , min^{-1} |
|-----------------|--------------------|-------------------------|
| 60 | $16,51 \pm 7,09^*$ | $0,014 \pm 0,009$ |
| 70 | $17,24 \pm 7,32$ | $0,133 \pm 0,045$ |
| 80 | $17,33 \pm 7,32$ | $0,132 \pm 0,026$ |
| 90 | $16,83 \pm 4,02$ | $0,136 \pm 0,028$ |
| 100 | $15,31 \pm 2,43$ | $0,150 \pm 0,012$ |
| E_a , kJ/mol | $10,18 \pm 5,89$ | |

*abaterea medie pătratică

După cum evidențiază figura 6.7, cinetica de degradare termică a antocianilor din extractul rezultat din fracțiunea 6 din făina de orez negru la diferite temperaturi, urmează un model de degradare de ordinul I, iar în ceea ce privește conținutul total de antociani acesta

descrește de la valoarea de $0,053 \pm 0,018$ C₃G mg/g la valoarea de $0,015 \pm 0,006$ C₃G mg/g în domeniul de temperatură de 25-100 °C în condițiile tratamentului termic pentru o perioadă de timp de 5-20 de minute.

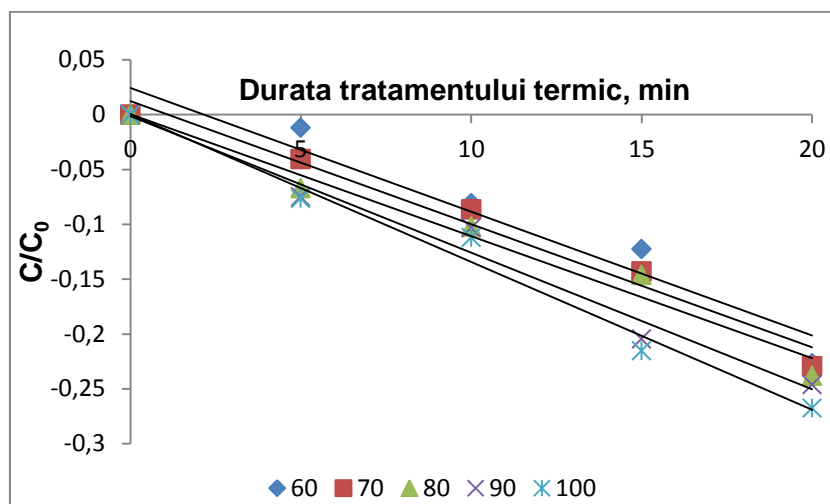


Figura 6.7. Cinetica de degradare termică a antocianilor din extractul obținut din fracțiunea 6 din făina de orez negru la diferite temperaturi (C este concentrația extractului la timpul t , C_0 este concentrația inițială a extractului)

Spre deosebire de fracțiunile caracterizate anterior, în cazul fracțiunii 6 valoarea constantei de degradare k oscilează între $0,050$ și $0,056$ min⁻¹ în intervalul de temperatură studiat. Același comportament se remarcă și în cazul parametrului de reducere zecimală D . În intervalul de temperatură 60-70 °C valoarea parametrului k scade de la valoarea $0,056 \pm 0,012$ min⁻¹, la valoarea de $0,051 \pm 0,022$. Între temperaturile de 80-90 °C, valoarea lui k crește de la $0,050 \pm 0,014$ min⁻¹, la $0,053 \pm 0,021$ min⁻¹. La 100 °C, valoarea constantei de degradare k crește la valoarea de $0,056 \pm 0,011$ min⁻¹.

Cea de-a doua constantă de degradare termică, și anume timpul de reducere zecimală D , are un comportament similar cu parametrul de degradare k . La temperaturile de 60-70 °C, valoarea constantei D crește de la valoarea de $40,98 \pm 2,16$ min, la valoarea de $45,04 \pm 4,04$ min. Între 80-90 °C, valoarea lui D scade de la $45,24 \pm 1,03$ min, la $43,10 \pm 7,09$ min. La temperatura de 100 °C valoarea constantei de degradare D scade până la valoarea de $40,98 \pm 4,05$ min.

Energia de activare calculată pentru extractul rezultat din fracțiunea 6 este de $11,99 \pm 1,81$ kJ/mol.

Tabelul 6.7. Parametrii cinetici estimați pentru conținutul de antociani monomerici totali (constantele de degradare- k , D și energiile de activare- E_a) pentru fracțiunea 6 din făina de orez negru

| Temperatură, °C | D , min | k , min ⁻¹ |
|-----------------|--------------------|-------------------------|
| 60 | $40,98 \pm 2,16^*$ | $0,056 \pm 0,012$ |
| 70 | $45,04 \pm 4,04$ | $0,051 \pm 0,022$ |
| 80 | $45,24 \pm 1,03$ | $0,050 \pm 0,014$ |
| 90 | $43,10 \pm 7,09$ | $0,053 \pm 0,021$ |
| 100 | $40,98 \pm 4,05$ | $0,056 \pm 0,011$ |
| E_a , kJ/mol | $11,99 \pm 1,81$ | |

*abaterea medie pătratică

Cinetica de degradare termică a extractului rezultat din fracțiunea 7 din făina de orez negru la diferite temperaturi urmează un model de degradare de ordinul I (Figura 6.8). Conținutul de antociani din fracțiunea 7 scade treptat de la valoarea de $0,024 \pm 0,001$ mg C_3G /g la valoarea de $0,008 \pm 0,001$ C_3G mg/g.

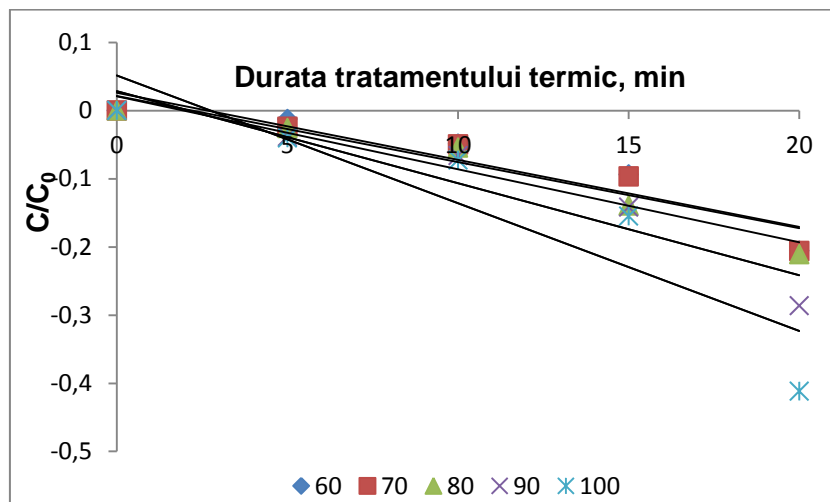


Figura 6.8. Cinetica de degradare termică a antocianilor din extractul obținut din fracțiunea 7 din făina de orez negru la diferite temperaturi (C este concentrația extractului la timpul t , C_0 este concentrația inițială a extractului)

Potrivit tabelului 6.8, unde sunt reprezentate valorile constantelor de degradare termică k și D , putem constata că valorile parametrului cinetic de degradare termică k cresc în intervalul de temperaturi studiate, pe când valorile timpului de reducere zecimală D scad odată cu creșterea temperaturii.

La temperatura de 60 °C și 70 °C valoarea constantei k scade de la $0,030 \pm 0,012$ min^{-1} , la $0,029 \pm 0,008$ min^{-1} . La 80-90 °C valoarea constantei de degradare k crește de la valoarea de $0,033 \pm 0,022$ min^{-1} , la valoarea de $0,039 \pm 0,023$ min^{-1} . Constanta de degradare termică k înregistrează la temperatura de 100 °C o valoare crescătoare de $0,051 \pm 0,022$ min^{-1} .

Cu privire la timpul de reducere zecimală se poate observa că între 60 și 70 °C valoarea crește de la $76,33 \pm 17,00$ min, la $76,92 \pm 17,09$ min. Valoarea lui D la 80-90 °C scade de la $68,02 \pm 10,20$ min, la $58,13 \pm 4,33$ min. La temperatura de 100 °C valoarea timpului de reducere zecimală D scade până la valoarea de $44,64 \pm 2,11$ min.

Pentru fracțiunea 7 s-a calculat în urma tratamentului termic o energie de activare de $13,79 \pm 3,20$ kJ/mol.

Tabelul 6.8. Parametrii cinetici estimați pentru conținutul de antociani monomerici totali (constantele de degradare- k , D și energiile de activare- E_a) pentru fracțiunea 7 din făina de orez negru

| Temperatură, °C | D , min | k , min ⁻¹ |
|-----------------|--------------|-------------------------|
| 60 | 76,33±17,01* | 0,030±0,012 |
| 70 | 76,92±17,01 | 0,029±0,008 |
| 80 | 68,02±10,20 | 0,033±0,022 |
| 90 | 58,13±4,33 | 0,039±0,023 |
| 100 | 44,64±2,11 | 0,051±0,022 |
| E_a , kJ/mol | 13,79±3,20 | |

*abaterea medie pătratică

6.3.1.4. Efectul tratamentului termic asupra activității antioxidante din fracțiunile de făină de orez negru

Rezultatele degradării termice în domeniul de temperatură 25–100 °C, au indicat că cinetica de degradare a capacității antioxidante răspunde unui model de ordinul întâi (figura 6.26). Capacitatea antioxidantă în urma tratamentului termic scade de la valoarea de 60,004±2,3 % la valoarea de 47,183±1,45 %.

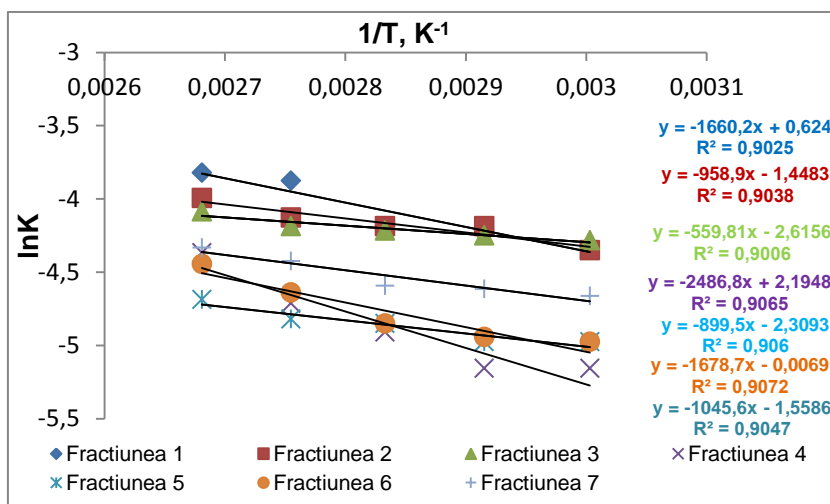


Figura 6.25. Dependenta de temperatură a constantei vitezei de degradare termică a capacității antioxidante din cele 7 fracțiuni din făina de orez negru

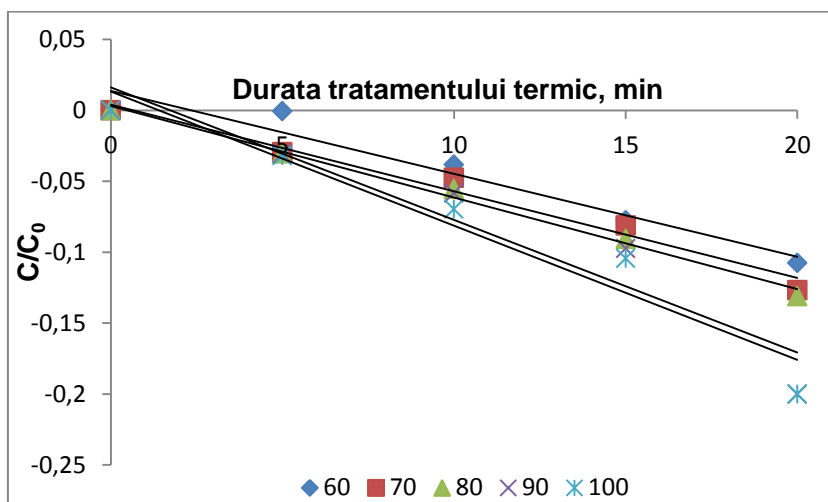


Figura 6.26. Cinetica de degradare termică a activității antioxidante din extractul obținut din fracțiunea 1 la diferite temperaturi (C este concentrația extractului la timpul t , C_0 este concentrația inițială a extractului)

Valoarea constantei de degradare k crește odată cu creșterea temperaturii în timp ce valoarea timpului de reducere zecimală (D) scade odată cu creșterea temperaturii, rezultate ce indică reducerea activității antioxidante a fracțiunii 1 din făina de orez negru.

Degradarea termică a activității antioxidante din fracțiunea 1 s-a caracterizat printr-o energie de activare de $16,61 \pm 3,98$ kJ/mol.

Tabelul 6.26. Parametrii cinetici estimați pentru activitatea antioxidantă (constantele de degradare- k , D și energiile de activare- E_a) pentru fracțiunea 1 din făina de orez negru

| Temperatură, °C | D , min | k , min ⁻¹ |
|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| 60 | $172,41 \pm 17,04^*$ | $0,013 \pm 0,011$ |
| 70 | $158,73 \pm 14,01$ | $0,014 \pm 0,011$ |
| 80 | $151,51 \pm 10,00$ | $0,014 \pm 0,009$ |
| 90 | $111,11 \pm 7,01$ | $0,021 \pm 0,012$ |
| 100 | $105,26 \pm 7,00$ | $0,021 \pm 0,005$ |
| E_a, kJ/mol | $16,61 \pm 3,98$ | |

*abaterea medie pătratică

În figura figura 6.27 este prezentat comportamentul de degradare termică a extractului rezultat din fracțiunea 2 din făina de orez negru în intervalul de temperatură de 60 °C până la 100 °C, care răspunde unui model cinetic de ordinul I.

Tratamentul termic la diferite temperaturi și pentru perioade de timp de maxim 20 min a determinat reducerea capacitatea antioxidante a fracțiunii 2 de la valoarea de $60,521 \pm 5,03$ % la $41,041 \pm 1,75$ %.

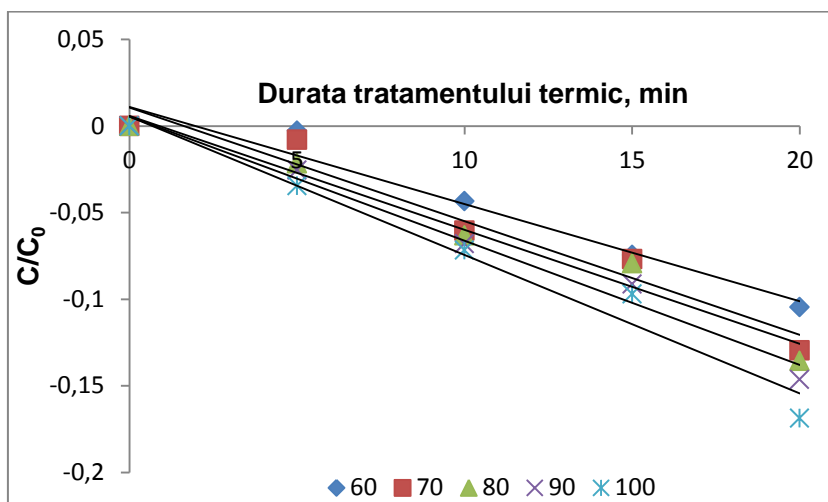


Figura 6.27. Cinetica de degradare termică a activității antioxidante din extractul obținut din fracțiunea 2 la diferite temperaturi (C este concentrația extractului la timpul t , C_0 este concentrația inițială a extractului)

Conform rezultatelor prezentate în tabelul 6.27, parametrii cinetici pentru activitatea antioxidantă din fracțiunea 2 variază în funcție de intervalul de temperatură aplicat, în mod similar celor din fracțiunea 1. În cazul constantei de degradare k , se poate observa o creștere a valorii acesteia în domeniul de temperatură de 60-100 °C. În ceea ce privește constanta de degradare D , în cazul acesteia reiese faptul că are loc o descreștere în intervalul de temperatură considerat în studiu. Pentru fracțiunea 2 din făina de orez negru s-a calculat o energie de activare de $8,27 \pm 1,30$ kJ/mol.

Tabelul 6.27. Parametrii cinetici estimați pentru activitatea antioxidantă (constantele de degradare- k , D și energiile de activare- E_a) pentru fracțiunea 2 din făina de orez negru

| Temperatură, °C | D , min | k , min ⁻¹ |
|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| 60 | $178,57 \pm 17,56^*$ | $0,012 \pm 0,009$ |
| 70 | $151,51 \pm 10,02$ | $0,015 \pm 0,011$ |
| 80 | $151,51 \pm 10,02$ | $0,015 \pm 0,007$ |
| 90 | $142,85 \pm 10,00$ | $0,016 \pm 0,012$ |
| 100 | $125,00 \pm 8,01$ | $0,018 \pm 0,011$ |
| E_a, kJ/mol | $8,27 \pm 1,30$ | |

*abaterea medie pătratică

Rezultatele degradării termice în domeniul de temperatură 60–100 °C a activității antioxidante din fracțiunea 3 din făina de orez negru, au arătat faptul că aceasta urmează un model cinetic de ordinul întâi.

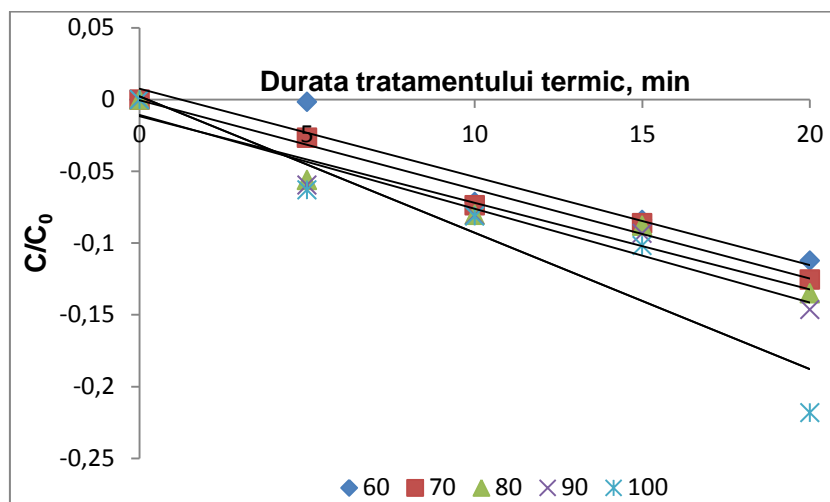


Figura 6.28. Cinetica de degradare termică a activității antioxidante din extractul obținut din fracțiunea 3 la diferite temperaturi (C este concentrația extractului la timpul t, C₀ este concentrația inițială a extractului)

În urma tratamentului termic asupra fracțiunii 3 din făina de orez negru, capacitatea antioxidantă scade de la o valoare de 63,758±1,61 % la valoarea de 38,580±2,32 %.

Tabelul 6.28 pune în evidență constantele de degradare cinetică k și D ale căror valori variază în funcție de domeniul de temperatură efectuat.

Odată cu creșterea valorii constantei de degradare k , scade timpul de reducere zecimală D , rezultând faptul ca are loc reducerea activității antioxidante.

Energia de activare calculată pentru extractul fracțiunii 3 a înregistrat o valoare de 9,39±4,87 kJ/mol.

Tabelul 6.28. Parametrii cinetici estimați pentru activitatea antioxidantă (constantele de degradare- k , D și energiile de activare- E_a) pentru fracțiunea 3 din făina de orez negru

| Temperatură, °C | D , min | k , min ⁻¹ |
|-----------------|---------------|-------------------------|
| 60 | 166,66±14,04* | 0,013±0,013 |
| 70 | 161,29±14,02 | 0,014±0,005 |
| 80 | 156,25±12,00 | 0,014±0,006 |
| 90 | 151,51±10,03 | 0,015±0,011 |
| 100 | 136,98±10,00 | 0,016±0,013 |
| E_a , kJ/mol | 9,39±4,87 | |

*abaterea medie pătratică

Cinetica de degradare termică a activității antioxidante a extractului rezultat din fracțiunea 4 din făina de orez negru la diferite temperaturi este una de ordinul I.

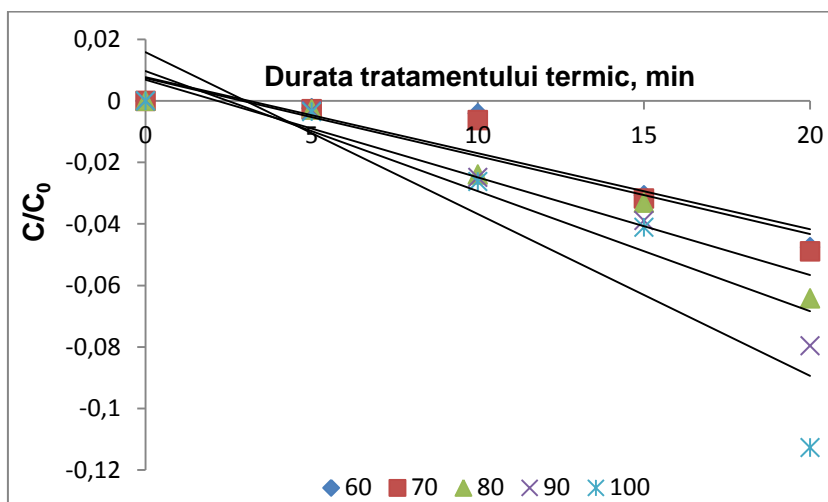


Figura 6.29. Cinetica de degradare termică a activității antioxidante din extractul obținut din fracțiunea 4 la diferite temperaturi (C este concentrația extractului la timpul t , C_0 este concentrația inițială a extractului)

Tratamentul termic timp de 5-20 de minute în domeniul de temperatură studiat, 25-100 °C determină reducerea treptată a capacității antioxidante a fracțiunii 4 de la valoarea de $62,901 \pm 3,02$ % la valoarea de $48,516 \pm 2,11$ %.

Ca și în cazul celorlalte fracțiuni, constantele de degradare termică, k și timpul de reducere zecimală D , prezintă variații în funcție de temperatură (tabelului 6.29). Energia de activare calculată pentru extractul rezultat din fracțiunea 4 din făina de orez negru supus tratamentului termic la diferite temperaturi a fost $19,93 \pm 3,49$ kJ/mol.

Tabelul 6.29. Parametrii cinetici estimați pentru activitatea antioxidantă (constantele de degradare- k , D și energiile de activare- E_a) pentru fracțiunea 4 din făina de orez negru

| Temperatură, °C | D , min | k , min ⁻¹ |
|---------------------------------|----------------------|-------------------------|
| 60 | $400,00 \pm 21,02^*$ | $0,005 \pm 0,002$ |
| 70 | $400,00 \pm 21,02$ | $0,005 \pm 0,003$ |
| 80 | $312,50 \pm 19,03$ | $0,007 \pm 0,004$ |
| 90 | $256,41 \pm 17,05$ | $0,008 \pm 0,002$ |
| 100 | $181,81 \pm 14,20$ | $0,012 \pm 0,001$ |
| E_a, kJ/mol | $19,93 \pm 3,49$ | |

*abaterea medie pătratică

Se poate observa din figura numărul 6.30 că pentru fracțiunea din făina de orez negru cinetica de degradare în urma tratamentului termic aplicat este de ordinul I.

Capacitatea antioxidantă a fracțiunii 5 scade de la valoarea de $68,231 \pm 4,10$ % la valoare de $51,764 \pm 2,8$ %.

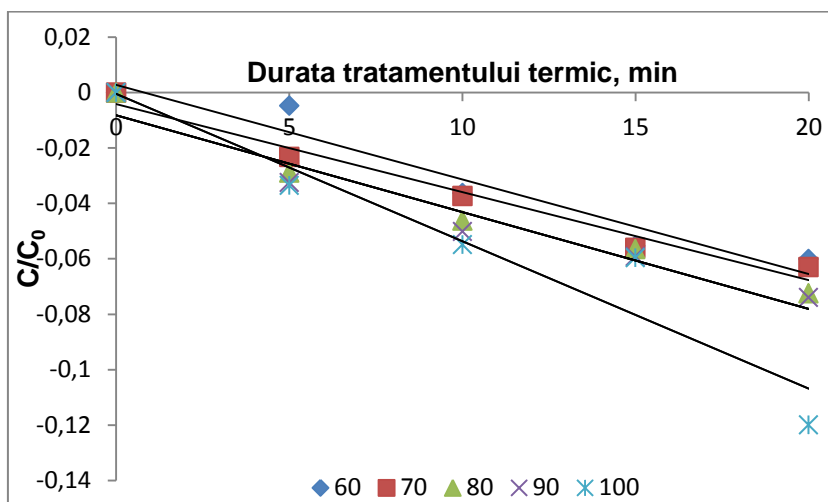


Figura 6.30. Cinetica de degradare termică a activității antioxidante din extractul obținut din fracțiunea 5 la diferite temperaturi (C este concentrația extractului la timpul t , C_0 este concentrația inițială a extractului)

Tabelul 6.30 demonstrează faptul că, în cazul activității antioxidante a fracțiunii 5, constanta de degradare k înregistrează o creștere în domeniul de temperatură testat, în timp valorile constantei de degradare D descresc, fapt ce evidențiază scăderea activității antioxidante.

În cazul extractului obținut din fracțiunea 5 valoarea energiei de activare este $9,82 \pm 5,23$ de kJ/mol.

Tabelul 6.30. Parametrii cinetici estimați pentru activitatea antioxidantă (constantele de degradare- k , D și energiile de activare- E_a) pentru fracțiunea 5 din făina de orez negru

| Temperatură, °C | $D(\text{min})$ | $k(\text{min}^{-1})$ |
|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| 60 | $333,33 \pm 20,06^*$ | $0,006 \pm 0,002$ |
| 70 | $333,33 \pm 20,06$ | $0,006 \pm 0,002$ |
| 80 | $294,11 \pm 20,06$ | $0,007 \pm 0,003$ |
| 90 | $285,71 \pm 20,00$ | $0,008 \pm 0,002$ |
| 100 | $250,00 \pm 17,02$ | $0,009 \pm 0,003$ |
| E_a, kJ/mol | $9,82 \pm 5,23$ | |

*abaterea medie pătratică

După cum evidențiază figura 6.31 cinetica de degradare termică a extractului rezultat din fracțiunea 6 din făina de orez negru la diferite temperaturi, urmează un model de degradare de ordinul I.

În cazul extractului fracțiunii 6, capacitatea antioxidantă scade de la $61,627 \pm 2,54$ % la $46,029 \pm 1,18$ %.

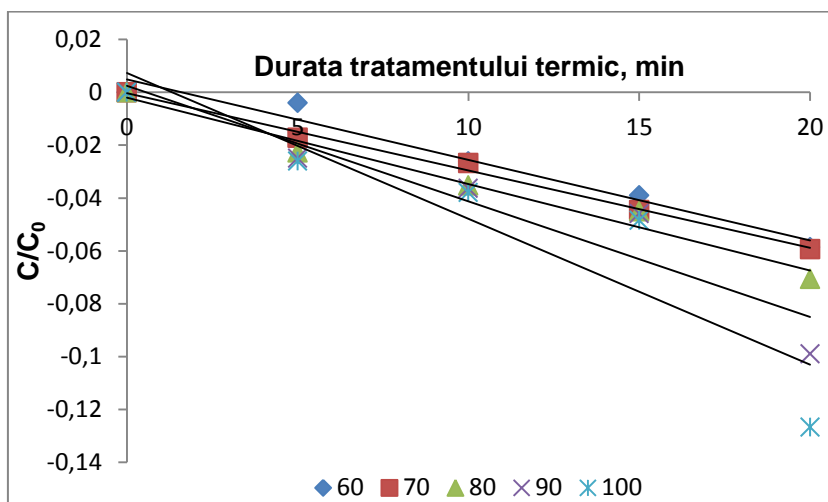


Figura 6.31. Cinetica de degradare termică a activității antioxidante din extractul obținut din fracțiunea 6 la diferite temperaturi (C este concentrația extractului la timpul t , C_0 este concentrația inițială a extractului)

În cazul fracțiunii 6 valoarea constantei de degradare k crește în intervalul de temperatură studiat de la $0,006 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}$ la $0,012 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$, în timp ce parametrul de reducere zecimală D descrește. Energia de activare calculată pentru extractul rezultat din fracțiunea 6 este de $16,61 \pm 3,98 \text{ kJ/mol}$.

Tabelul 6.31. Parametrii cinetici estimați pentru activitatea antioxidantă (constantele de degradare- k , D și energiile de activare- E_a) pentru fracțiunea 6 din făina de orez negru

| Temperatură, °C | D , min | k , min^{-1} |
|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| 60 | $333,33 \pm 9,00^*$ | $0,006 \pm 0,004$ |
| 70 | $322,58 \pm 8,06$ | $0,007 \pm 0,003$ |
| 80 | $294,11 \pm 8,00$ | $0,007 \pm 0,003$ |
| 90 | $238,09 \pm 8,00$ | $0,010 \pm 0,006$ |
| 100 | $196,07 \pm 7,09$ | $0,012 \pm 0,005$ |
| E_a, kJ/mol | $16,61 \pm 3,98$ | |

*abaterea medie pătratică

Cinetica de degradare termică a extractului rezultat din fracțiunea 7 din făina de orez negru la diferite temperaturi urmează un model de degradare de ordinul întâi, iar activitatea antioxidantă din fracțiunea 7 descrește de la o valoare de $59,001 \pm 1,31 \%$ la valoarea de $41,066 \pm 2,62 \%$.

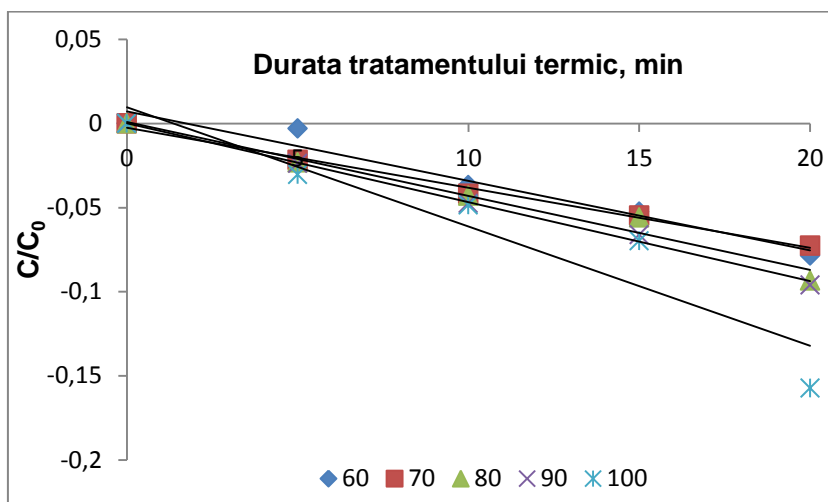


Figura 6.32. Cinetica de degradare termică a activității antioxidante a antocianilor din extractul obținut din fracțiunea 7 la diferite temperaturi (C este concentrația extractului la timpul t, C₀ este concentrația inițială a extractului)

Potrivit tabelului 6.32 unde sunt reprezentate valorile constantelor de degradare termică, se poate observa că valorile parametrului cinetic de degradare termică k cresc în intervalul studiat, pe când valorile timpului de reducere zecimală D scad odată cu creșterea temperaturii.

Pentru fracțiunea 7 s-a calculat în urma tratamentului termic o energie de activare de $13,80 \pm 5,49$ kJ/mol. Pentru reducerea semnificativă a activității antioxidante atât din fracțiunea 7 din făina de orez negru cât și din celelalte 6 fracțiuni este necesară o temperatură mai ridicată.

Tabelul 6.32. Parametrii cinetici estimați pentru activitatea antioxidantă (constantele de degradare- k , D și energiile de activare- E_a) pentru fracțiunea 7 din făina de orez negru

| Temperatură, °C | D , min | k , min ⁻¹ |
|-----------------|----------------------|-------------------------|
| 60 | $243,90 \pm 10,02^*$ | $0,009 \pm 0,012^*$ |
| 70 | $232,55 \pm 10,01$ | $0,009 \pm 0,006$ |
| 80 | $227,27 \pm 10,00$ | $0,010 \pm 0,011$ |
| 90 | $192,30 \pm 8,02$ | $0,011 \pm 0,010$ |
| 100 | $175,43 \pm 4,04$ | $0,016 \pm 0,011$ |
| E_a , kJ/mol | $13,80 \pm 5,49$ | |

*abaterea medie pătratică

6.4. Concluzii parțiale

- Efectul temperaturii asupra procesului de degradare a compușilor fenolici din extractul din făina de orez negru a fost examinat pe baza unui studiu cinetic.
- Conținutul de antociani din fracțiunea 1 scade în urma tratamentului termic odată cu creșterea temperaturii în intervalul 25-100 °C, de la valoarea de $0,058 \pm 0,012$ C₃G mg/g la valoarea de $0,001 \pm 0,0001$ C₃G mg/g, aceeași tendință înregistrându-se și în cazul celorlalte fracțiuni din făina de orez negru.
- Conținutul total de fenoli, flavonoide și antociani monomerici, urmează un model cinetic de ordinul I.

- Constantele ratelor de degradare au arătat că odată cu creșterea temperaturii se intensifică și procesul de degradare, iar acest lucru a fost exprimat cu ajutorul valorilor energiilor de activare (E_a).
- În urma tratamentului termic s-au calculat constantele de degradare termică, constanta k și timpul de reducere zecimală D , pentru fiecare fracțiune după cum urmează :
- În fracțiunea 1 degradarea termică a compușilor antocianici are loc între temperatura de 60-80 °C deoarece valoarea constantei de degradare k crește odată cu creșterea temperaturii până la 80 °C, după care valoarea lui k scade, în timp ce valoarea timpului de reducere zecimală (D) scade odată cu creșterea temperaturii până la 80°C .
- Fracțiunea cu cea mai mare valoare a energiei de activare a fost fracțiunea 7 cu o valoare de $13,79 \pm 3,20$ kJ/mol, iar cea mai mică valoare a energiei de activare a fost calculată la fracțiunea 1 având valoarea de $0,25 \pm 2,60$ kJ/mol, dar și fracțiunea F2.
- În intervalul de temperatură 60-100 °C, activitatea antioxidantă a fracțiunile studiate prezintă o scădere semnificativă.
- Pentru a putea degrada compușii existenți în cele șapte fracțiuni este necesar o durată mai mare de tratament și o temperatură mai ridicată.
- Constantele ratelor de degradare au arătat că odată cu creșterea temperaturii se intensifică și procesul de degradare, iar acest lucru a fost exprimat cu ajutorul valorilor energiilor de activare (E_a), care au fost mai mici decât cele identificate în literatura de specialitate, fapt ce demonstrează termostabilitatea ridicată a antocianilor prezenți în făina de orez negru.

7. Obținerea unui produs funcțional destinat persoanelor cu intoleranțe alimentare

7.1. Aspecte generale

Biscuiții sunt cele mai populare articole de panificație consumate pe scară largă de populație. Acest lucru se datorează în principal naturii lor, calității nutritive și disponibilității unor sortimente diferite la costuri accesibile. Cele mai multe dintre produsele de panificație sunt folosite ca sursă pentru încorporarea diferitelor ingrediente bogate din punct de vedere nutrițional. Mai multe tipuri de produse menite să apere sănătatea au devenit acum disponibile. Fibrele dietetice joacă un rol foarte important în dieta umană. Fibrele alimentare, constând în celuloză digerabilă, hemiceluloză, lignină, gume și mucilagii, oferă o varietate de beneficii pentru sănătate.

7.2. Materiale și metode

Materiile prime utilizate pentru obținerea biscuiților aperitiv au fost procurate dintr-un supermarket local din Galați, acestea fiind: orez negru, tărâță de ovăz, semințe de chia, migdale, piper negru, rozmarin, cimbru, sare și praf de copt.

Făina de orez negru a fost obținută prin măcinarea fină într-o moară de laborator (Mlynek Laboratory JNY Tip WZ/2) a boabelor de orez. Această făină a constituit ingredientul principal folosit pentru obținerea biscuiților aperitiv. Făina de orez negru are în compoziția sa o serie de compuși biologic activi (antociani, fenoli, flavonoide) și nu conține gluten. Făină de orez negru aduce aport de minerale și vitamine, ajutând astfel la menținerea sănătății, îmbunătățirea metabolismului, funcționarea sistemului nervos, previne atacurile de cord, reduce nivelul colesterolului, îmbunătățește sistemul osos și muscular, îmbunătățește memoria și circulația sângelui, previne bolile de inimă, neoplasmul, diabetul, hipertensiunea, astmul și boala Alzheimer, fiind un bun antioxidant și antiinflamator natural.

Reactivii utilizați au fost: indicator roșu de metil-albastru de metilen, indicator roșu de metil-verde de bromcrezol, soluție de hidroxid de sodiu-tiosulfat de sodiu, soluție de etanol 70 %, metanol de puritate HPLC, soluție de NaNO_2 5 % (m/v), soluție de AlCl_3 10 % (m/v), soluție de NaOH 1M, reactiv Folin-Ciocalteu, soluție Na_2CO_3 20 % (m/v), soluție de KCl 0,025 M, pH=1.0, soluție de $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,4 M, pH=4, soluție de acid formic 3–5 %, reactiv DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), soluție TROLOX, soluție acid galic, acid boric, 4%, acid clorhidric, 0,02 n, sulfat de potasiu, pulbere, oxid de mercur, eter de petrol, cu interval de distilare 40-60 °C, hidroxid de sodiu 0,23 mol/l sau hidroxid de sodiu 0,313 mol/l, acid sulfuric 0,13 mol/l, apă distilată, medii de cultură rose-bengal, petrifilme 3M Enterobacteriaceae Count Plate, apă distilată sterilă, cocktail (patented) (R7006/R7016, official AOAC method).

7.5. Rezultate și discuții

7.5.1. Caracterizarea fizico-chimică a biscuiților aperitiv

Rezultatele analizelor fizico-chimice efectuate asupra produsului funcțional destinat persoanelor cu intoleranțe alimentare (biscuiți aperitiv) sunt prezentate în tabelul 7.1.

Tabelul 7.1. Compoziția fizico-chimică a biscuiților aperitiv

| Biscuiți | Parametri | |
|-----------------|------------------|--------------|
| | Cenușă g/100g | 5,49±2,03 |
| | Lipide g/100g | 16,71±4,06 |
| | Proteine % | 22,25 ± 1,14 |
| | Umiditate % | 4,46±1,12 |
| | Fibre % | 8,99±2,5 |

Conform rezultatelor prezentate în tabelul 7.1 se poate aprecia că biscuiții aperitiv obținuți la nivel de laborator, utilizând ca bază făina din orez negru, prezintă un conținut ridicat de proteine și fibre (22,25 ± 1,14 % respectiv 8,99±2,5 %). Având în vedere conținutul ridicat de fibre din biscuiții aperitiv, datorat materiilor prime folosite la obținerea acestora, este posibilă inscripționarea pe eticheta produsului a mențiunii “Bogat în fibre”.

7.5.2. Evoluția conținutului de compuși biologic activi pe perioada de depozitare

Conținutul inițial de compuși biologic activi a fost evaluat în aluatul folosit pentru obținerea biscuiților, înainte de operația de coacere. Aluatul obținut conform schemei tehnologice prezentate în Figura 7.1, a prezentat următorul conținut de compuși biologic activi: CTA 0,0035±0,0002 g C₃G/100 g; CPT 1,32±0,01 g AC/100 g; CFT 0,87±0,01 g EC/100 g; 47,96±0,71 % DPPH. În tabelul 7.2 este prezentată evoluția conținutului total de antociani (CTA), a conținutului de polifenoli totali (CPT), a conținutului de flavonoide (CFT) dar și a activității antioxidante pe parcursul unei perioade de depozitare de 21 zile a biscuiților.

Tabelul 7.2. Evoluția conținutului de compuși biologic activi pe parcursul depozitării la temperatura camerei

| Compuși biologic activi | Perioadă de depozitare, zile | | | |
|--------------------------------|-------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | 0 | 7 | 14 | 21 |
| CTA, g C ₃ G/100 g | 0,0050±0,0009 | 0,0024±0,0001 | 0,0024±0,0003 | 0,0024±0,0001 |
| CPT, g AC/100 g | 1,62±0,05 | 1,66±0,08 | 1,77±0,15 | 1,88±0,07 |
| CFT, g EC/100 g | 1,51±0,77 | 2,28±0,24 | 2,28±0,06 | 2,3±0,57 |
| DPPH, % | 66±1,66 | 74,32±0,16 | 76,94±3,06 | 77,01±0,80 |

Analizând rezultatele prezentate în Tabelul 7.2 se poate observa că biscuiții aperitiv înregistrează o scădere a conținutului total de antociani în primele 7 zile de depozitare, după care valoarea se menține constantă până la 21 de zile (0,0024±0,0001 mg C₃G/100 g), în timp ce conținutul total de polifenoli și flavonoide crește ușor pe parcursul întregii perioade considerată în studiu. Evoluția activității antioxidante a biscuiților aperitiv urmează același trend precum cel observat în cazul conținuturilor de polifenoli și flavonoide. Se poate astfel aprecia că polifenolii totali și flavonoidele influențează preponderent activitatea antioxidantă a biscuiților.

7.5.3. Digestibilitate in vitro

În studiul de față, s-a realizat o cinetică de eliberare a compușilor antocianici din biscuiți în timpul digestibilității in vitro (Figura 7.2). În suc gastric simulat, s-a observat o scădere a conținutului de antociani monomerici totali, cu circa 34% în primele 30 minute de digestie și aproximativ 44% după 120 de minute. În suc intestinal simulat, s-a observat o creștere a

eliberării compușilor antocianici (Figura 7.2), de circa 3 ori după 30 de minute de digestie intestinală și de circa 5 ori după 120 de minute. Se poate concluziona, că matricea complexă a biscuiților a permis o protejare a compușilor antocianici în sucul gastric, permițând eliberarea lor în sucul intestinal. Eliberarea antocianilor în timpul simulării digestiei gastrice sugerează că proteinele protejează antocianii, permițând, astfel, o eliberare controlată a compușilor bioactivi sub influența enzimelor gastrice și intestinale din sucurile simulate.

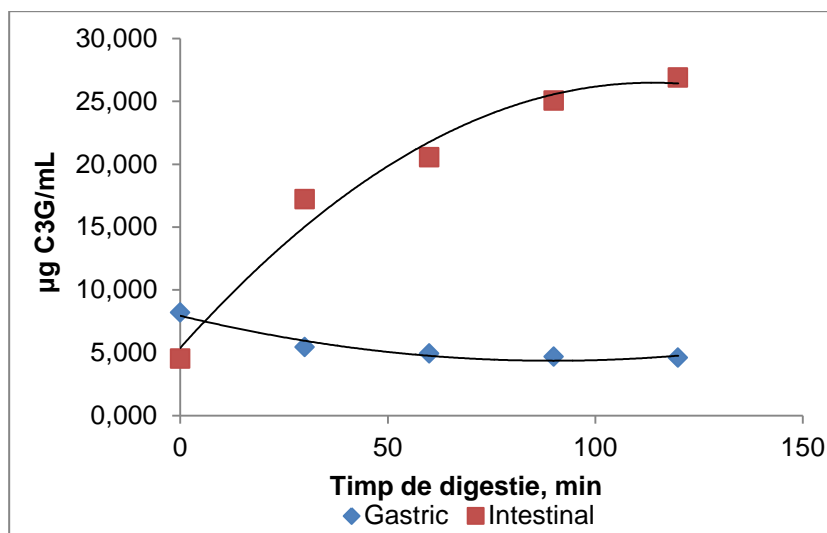


Figura 7.2. Conținutul de antociani în urma digestiei simulate gastrice și intestinale a biscuiților aperitiv

7.5.4. Testarea potențialului antigenic al biscuiților aperitiv

Testul ELISA bazat pe anticorpul monoclonal R5, care a fost sugerat de Codex Alimentarius (2005) pentru analiza produselor alimentare, a fost utilizat pentru cuantificarea proprietăților antigenice ale gliadinelor eventual prezente în biscuiții pe bază de făină din orez negru. În urma analizei ELISA s-a putut constata faptul că valoarea obținută este sub limita admisă de 20 mg/kg gluten, ceea ce indică absența proteinelor cu potențial alergen din biscuiții aperitiv aglutenici. Conform analizei ELISA, biscuiții aperitiv pot fi încadrați cu succes în categoria produselor aglutenice.

7.5.5. Rezultatele determinării colorimetrice

Valorile indicilor de culoare L^* a^* b^* măsurați cu ajutorul instrumentului HunterLab Miniscan XEPlus sunt prezentate în Tabelul 7.3. În spațiul culorii CIE $L^*a^*b^*$ coordonatele culorilor în sistem rectangular sunt: L^* - coordonata luminozității: 0 (negru) până la 100 (alb); a^* - coordonata roșu/verde, cu $+a^*$ indicând roșu și $-a^*$ indicând verde; b^* - coordonata galben/albastru, cu $+b^*$ indicând galben și $-b^*$ indicând albastru. Valorile indicilor colorimetrici a^* și b^* indică faptul că biscuiții aglutenici au culoarea cu nuanțe de roșu-portocaliu stabile și galben a cărui intensitate se reduce gradual pe parcursul depozitării. Luminozitatea (L^*) a rămas constantă pe parcursul întregii perioade de păstrare a biscuiților pe bază de orez negru.

Tabelul 7.3. Indicatorii colorimetrici ai biscuiților aperitiv aglutenici

| Indici | Inițial | După 7 zile | După 14 zile | După 21 zile |
|--------|------------|-------------|--------------|--------------|
| L* | 39,14±0,36 | 39,20±0,21 | 39,24±0,13 | 39,26±0,02 |
| a* | 7,63±0,11 | 7,41±0,04 | 7,14±0,11 | 7,05±0,05 |
| b* | 14,26±0,16 | 13,04±0,08 | 11,23±0,06 | 9,52±0,07 |

Din tabelul 7.3, reiese faptul că valorile indicilor colorimetrici L*, a* și b* nu variază foarte mult în decursul celor 21 de zile, ceea ce înseamnă că biscuiții aglutenici își păstrează culoarea de-a lungul perioadei de valabilitate.

7.5.6. Analize microbiologice

Analiza numărului total de drojdii și mucegaiuri, conform SR ISO 21527/1, a demonstrat faptul că biscuiții aperitiv aglutenici sunt satisfăcători din punct de vedere microbiologic până la finalul perioadei studiate de 21 de zile. În baza acestor rezultate se poate aprecia că, parametrii utilizați la coacere au fost corespunzători determinând distrugerea tuturor microorganismelor, iar produsul funcțional destinat persoanelor cu intoleranțe alimentare (biscuiți aperitiv aglutenici) este sigur de consum din punct de vedere microbiologic.

Tabelul 7.4. Criterii microbiologice și de igienă pentru produsul funcțional destinat persoanelor cu intoleranțe alimentare (biscuiți aperitiv aglutenici)

| Produs | Microorganisme | Inițial | După 7 zile | După 14 zile | După 21 de zile |
|----------|-----------------------|---------|-------------|--------------|-----------------|
| Biscuiți | Drojdii și mucegaiuri | Absent | Absent | Absent | Absent |

7.5.7. Analize senzoriale

În luarea deciziei de acceptare sau respingere a produselor alimentare, calitățile psiho-senzoriale au un rol deosebit de important, influențând reacția consumatorului față de produsele alimentare. Caracterizarea aromei și gustului unui produs nu este posibilă decât prin intermediul analizei senzoriale.

Rezultatele analizei senzoriale efectuate asupra biscuiților aperitiv sunt prezentate în Figurile 7.3 și 7.4.

Calitatea unui produs reprezintă totalitatea caracteristicilor capabile să satisfacă necesitățile consumatorilor. Analiza senzorială este parte componentă a conceptului de calitate și reprezintă metoda de examinare a unui produs cu ajutorul simțurilor umane de bază cum ar fi: auzul, văzul, gustul și mirosul. Metodele analizei senzoriale pot fi obiective și subiective. *Metoda subiectivă* este analiza hedonică sau testul de preferințe care măsoară aprecierea unui produs de către consumatorii „naivi”, pe când *metoda obiectivă* este analiza senzorială efectuată în laborator de către un grup de experți antrenați. În ceea ce privește profilul senzorial al biscuiților aperitiv aglutenici se poate observa din figura 7.3, că în timpul degustării mirosul, aroma, aftertaste-ul și gustul au fost percepute de către paneliști într-o măsură mai mare, acordându-le astfel un punctaj mare. În schimb mauthfeel-ul perceput de paneliști a înregistrat un punctaj mai mic față de celelalte caracteristici senzoriale analizate.

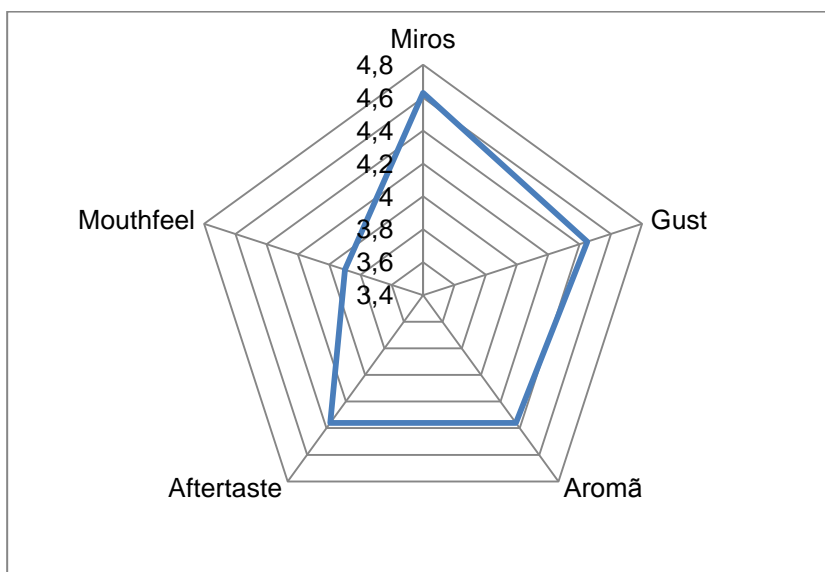


Figura 7.3. Profilul senzorial al produsului funcțional destinat persoanelor cu intoleranțe alimentare (biscuiți aperitiv aglutenici)

Conform rezultatelor prezentate în figura 7.4, se observă că aspectul în secțiune, rezultat în urma ruperii biscuiților în două a avut un punctaj ridicat la fel ca și grosimea acestora. În schimb celelalte atribute senzoriale au avut un punctaj mai mic acordat de paneliști deoarece biscuiții nu au o suprafață netedă, fiind foarte subțiri și crocanți.

În baza rezultatelor analizei senzoriale, se poate aprecia că biscuiții aperitiv aglutenici, au fost foarte apreciați de către paneliști, în special datorită gustului și sașietății acestora.

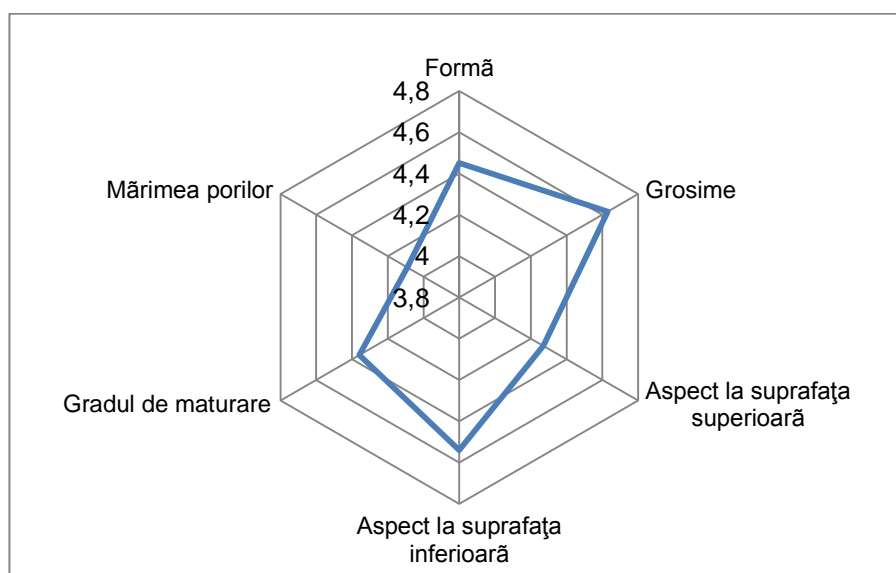


Figura 7.4. Profilul senzorial al produsului funcțional destinat persoanelor cu intoleranțe alimentare (biscuiți aperitiv aglutenici) în ceea ce privește aspectul exterior și aspectul în secțiune

7.6. Concluzii parțiale

În urma cercetărilor privind prepararea și caracterizarea fizico-chimică, microbiologică și senzorială a produsului funcțional destinat persoanelor cu intoleranțe alimentare (biscuiți aperitiv aglutenici), se pot formula următoarele concluzii:

- S-a putut stabili o rețetă și o schemă tehnologică pentru prepararea unui sortiment de biscuiți aperitiv aglutenici, pe bază de făină din orez negru;
- Toate ingredientele folosite în obținerea acestor biscuiți vin cu un aport ridicat de proteine, fibre, compuși biologic activi care conferă efecte benefice organismului uman;
- Produsul obținut a fost analizat din punct de vedere fizico-chimic, microbiologic și senzorial;
- Rezultatele analizelor fizico-chimice și microbiologice au fost în acord cu Standardele specifice;
- Biscuiți aperitiv pe bază de făină din orez negru prezintă un conținut ridicat de proteine și fibre;
- Funcționalitatea biscuiților aperitiv aglutenici este dată și de conținutul ridicat de compuși biologic activi cu efect asupra sanogenezei;
- Studiile de digestibilitate *in vitro* au evidențiat că matricea complexă a biscuiților a permis o protejare a compușilor antocianici în sucul gastric, permițând eliberarea lor graduală în sucul intestinal;
- Biscuiții aperitiv pe bază de făină din orez negru nu prezintă potențial antigenic, putând fi încadrați cu succes în categoria produselor aglutenice;
- Această categorie de biscuiți se poate adresa unui cadru larg de consumatori, dar mai ales persoanelor care prezintă intoleranță la gluten (boala celiacă);
- Testele microbiologice au pus în evidență stabilitatea produsului pe parcursul depozitării timp de 21 zile; drojdiile și mucegaiurile au fost absente, biscuiții fiind astfel siguri pentru consum;
- Produsul este fabricat fără a utiliza aditivi de sinteză sau ingrediente modificate genetic, fiind în armonie cu natura și mediul înconjurător. Ca urmare a principiilor ecologice, în fabricarea acestor biscuiți inovatori, au fost excluși aditivii și substanțele complementare, produsele chimice sintetice, aromele artificiale, coloranții artificiali și toate organismele modificate genetic;
- Pentru ambalarea produsului funcțional destinat persoanelor cu intoleranțe alimentare (biscuiți aperitiv aglutenici) s-a propus un ambalaj care poate fi refolosit sau reciclat.
- Materiile prime, în special făina din orez negru, ingredientul pe care s-a pus accentul în această lucrare, sunt considerate ingrediente funcționale;
- Acest tip de biscuiți poate fi vândut în magazinele de profil ecologic, putând fi consumat de toate categoriile de consumatori în orice moment al zilei.

8. Concluzii generale

Studiul tezei de doctorat a vizat caracterizarea avansată a orezului negru măcinat în scopul obținerii unui produs funcțional destinat persoanelor cu intoleranțe alimentare. Pe baza rezultatelor experimentelor obținute și a concluziilor parțiale evidențiate la finalul fiecărui capitol, sunt prezentate parțial o serie de concluzii generale, după cum urmează:

Datorită nivelului ridicat de nutrienți orezul negru (*Oryza sativa L.*) a început să fie tot mai mult apreciat de către consumatori și de către cercetători. Conținutul ridicat de compuși biologic activi din orezul negru asigură proprietăți sanogenetice acestei materii prime.

Orezul negru a fost mărunțit și fracționat prin cernere utilizând site cu orificii de diferite dimensiuni. Făina din orez negru rezultată a prezentat granulație corespunzătoare pentru a fi utilizată în diferite formulări de produse alimentare. Analizele fizico-chimice au pus în evidență creșterea conținutului de proteine și lipide, odată cu reducerea dimensiunii particulelor din fracțiunile de făină obținute prin cernere. Investigațiile efectuate au oferit informații cu privire la distribuția preponderentă a componentelor structurii bobului de orez negru în diferite fracțiuni rezultate prin cernere.

Determinarea conținutului total de antociani, a conținutului de polifenoli totali, a flavonoidelor totale și determinarea activității antioxidante a fracțiunilor de făină din orez negru s-a realizat cu ajutorul metodei spectrofotometrice la diferite lungimi de undă (520-700 nm, 510 nm, 765 nm și 515 nm).

Făina din orez negru reprezintă o sursă bună de compuși biologic activi. Prin cernerea făinii din orez negru au rezultat șapte fracțiuni de făină cu diferite dimensiuni ale particulelor, care au fost caracterizate din punct de vedere al distribuției compușilor biologic activi. Au fost observate diferențe semnificative între diferite fracțiuni de făină din orez negru în ceea ce privește conținutul de antociani și acizi fenolici, dar și proprietățile antioxidante. Dintre cele șapte fracțiuni de făină de orez negru, F4 a prezentat cea mai mare cantitate de antociani și de polifenoli, în timp ce conținutul de flavoni și activitatea antioxidantă nu au variat semnificativ de la o fracțiune la alta. Se poate aprecia așadar că activitatea antioxidantă DPPH, se datorează în cea mai mare parte conținutului de flavonoide, dar și polifenolilor și antocianilor.

Prin metoda HPLC a fost pusă în evidență prezența a doi antociani și anume: cianidin-3-glucozidul (în cantitatea cea mai mare) și peonidin-3-glucozidul atât în făina integrală, cât și în fracțiunea F4.

Rezultatele referitoare la conținutul de compuși biologic activi și distribuția acestora ar putea ajuta producătorii de orez și specialiștii din industria alimentară să promoveze consumul de produse pe bază de orez, prin creșterea gradului de conștientizare a consumatorilor cu privire la beneficiile pentru sănătate.

Efectul temperaturii asupra procesului de degradare a compușilor fenolici din extractul de făină din orez negru a fost examinat pe baza unui studiu cinetic. Constantele ratelor de degradare au arătat că, odată cu creșterea temperaturii se intensifică și procesul de degradare, iar acest lucru a fost exprimat cu ajutorul valorilor energiilor de activare (*E_a*). În urma tratamentului termic s-au

calculat constantele de degradare termică, constanta k și timpul de reducere zecimală D , a compușilor biologic activi din fracțiunile de făină din orez negru.

Rezultatele obținute prin aplicarea tratamentului termic au sugerat faptul că antocianii sunt instabili la temperaturi înalte, acest lucru fiind evidențiat prin creșterea intensității fluorescenței, dar și a prezenței *red și blue-shift-urilor* lungimii de undă la care se înregistrează valoarea maximă a intensității fluorescenței. Tratamentul termic la temperaturi ridicate a condus inclusiv la degradarea compușilor fenolici din fracțiunile de făină din orez negru.

Studiile realizate au valoare de cercetare fundamentală și aplicativă. Astfel, rezultatele cercetărilor fundamentale realizate în prima parte a studiului au fost valorificate în scopul dezvoltării unui nou produs pe bază de orez negru. În acest sens s-a stabilit rețeta și tehnologia de obținere a unui sortiment de biscuiți aperitiv aglutenici. Produsul astfel obținut a fost analizat din punct de vedere fizico-chimic, microbiologic și senzorial. Ingredientele utilizate pentru obținerea biscuiților aperitiv au asigurat un conținut ridicat de proteine, fibre și compuși biologic activi în produsul finit, care poate fi considerat produs funcțional destinat inclusiv persoanelor ce suferă de alergii sau intoleranță la gluten. Biscuiții de tip aperitiv sunt produse sigure pentru consum, ce își păstrează proprietățile pe o perioadă de depozitare de 21 zile, la temperatura camerei.

9. Contribuții personale și perspective de continuare a cercetărilor

Cercetările prezentate în teza de doctorat includ o componentă fundamentală și o componentă aplicativă, ce conțin contribuții originale, după cum urmează:

Studiul de cercetare fundamentală a vizat caracterizarea avansată a făinii din orez negru, în special din punct de vedere al conținutului în compuși biologic activi. Originalitatea studiilor derivă din abordarea aleasă pentru efectuarea investigațiilor, care au vizat obținerea unei imagini de ansamblu cu privire la funcționalitatea orezului negru. Astfel, după măcinarea orezului negru, au fost separate, în baza dimensiunii particulelor, șapte fracțiuni de făină diferite care au fost utilizate pentru extracția compușilor biologic activi și fracțiunilor proteice.

Au fost utilizate tehnici moderne bazate pe spectroscopie de fluorescență pentru investigarea efectului tratamentului termic și al pH-ului mediului asupra modificărilor conformaționale și structurale ale moleculelor compușilor biologic activi din făina de orez negru.

Tehnica HPLC a fost utilizată pentru identificarea principalilor antociani existenți în făina din orez negru.

A fost investigat efectul tratamentului termic asupra principalelor fracțiuni proteice din făina de orez negru.

Rezultatele referitoare la stabilitatea compușilor biologic activi și a proteinelor la tratament termic permit procesarea bazată pe cunoaștere a făinii din orez negru, în scopul obținerii de produse alimentare, fără reduceri semnificative a potențialului biologic.

Rezultatele cercetărilor fundamentale au fost valorificate în scopul dezvoltării unui produs funcțional inovativ care a fost trimis pentru brevetare la OSIM. A fost propusă o tehnologie de obținere a biscuiților tip aperitiv pe bază de făină din orez negru. Produsul obținut nu conține gluten și este bogat în compuși biologic activi, putând fi considerat aliment funcțional.

Datele obținute reprezintă elemente de referință pentru cercetările viitoare, cu o importanță semnificativă științifică și aplicativă pentru înțelegerea modificărilor conformaționale apărute în urma unor tratamente termice aplicate în timpul procesării. Aceste cunoștințe permit obținerea unor produse alimentare cu funcționalitate ridicată.

În perspectivă, se vizează efectuarea unor studii în sensul valorificării potențialului biologic activ și/sau tehnologic al unor fracțiuni sau extracte de făină din orez negru, prin includerea acestora în diferite matrici alimentare. Vor fi considerate produsele lactate (iaurt, brânză) și produse obținute prin fermentație alcoolică (bere).

10. Diseminarea rezultatelor cercetărilor

Diseminarea rezultatelor cercetărilor efectuate pe parcursul studiilor doctorale s-au materializat prin publicarea sau comunicarea unor lucrări științifice după cum urmează:

Publicații în reviste ISI

1. **Carmen Bolea**, Mihaela Turturică, Nicoleta Stănciuc, Camelia Vizireanu. 2016. Thermal degradation kinetics of bioactive compounds from black rice flour (*Oryza sativa* L.) extracts. Journal of Cereal Science. 71,160-166. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521016301655>, (2,223).
2. Iuliana Aprodu, **Carmen Bolea**, Nicoleta Stănciuc, Livia Pătrașcu. 2017. Structural and antigenic properties of thermally treated gluten proteins. Food Chemistry. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.018>, (4,592).
3. **Carmen Bolea**, Leontina Gurgu (Grigore), Iuliana Aprodu, Camelia vizireanu, Nicoleta Stănciuc. 2018. Comparison of functional and structural heat induced properties of black rice flour milling fractions. Submis la revista Journal of Cereal Science, YJCRS_2018_322, (2,223).

Publicații în reviste BDI

1. **Carmen Bolea**, Camelia Vizireanu. 2017. Polyphenolic content and antioxidant properties of black rice flour. The Annals of the University Dunărea de Jos of Galați Fscicle VI-Food Technology, 41(2), 75-85.
2. **Carmen Bolea**, Iuliana Aprodu, Iuliana Banu. 2018. Impact of multigrain milling on the chemical profile of the mill streams. Scientific Study & Research – Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry (SCS-CICBIA), vol. 19, nr. 1, 2018.

Comunicări la conferințe internaționale

1. Participare la "European Biotechnology Congress", București, 2015, 7 – 9 mai 2015, cu lucrarea intitulată " Effect of Thermal Treatment on Phenolic Compounds from Black Rice", **Carmen Bolea**, Iuliana Aprodu, Iuliana Banu, Gabriela Bahrim, Camelia Vizireanu.

2. Participare la simpozionul internațional EuroAliment, editia a-7-a, Galați, 2015, 24 – 26 septembrie 2015, cu lucrarea intitulată "Thermal Degradation of Some Bioactive Compounds from Black Rice Flour", **Carmen Bolea**, Camelia Vizireanu, Iuliana Banu.
3. Participare la "European Biotechnology Congress", Croația, 2017, 25 – 27 mai 2017, cu lucrarea intitulată "Comparative analysis of enzyme activity in wheat, rye, triticale, oat and barley", **Carmen Bolea**, Iuliana Aprodu, Iuliana Banu.
4. Participare la simpozionul internațional EuroAliment, editia a-8-a, Galați, 2017, 7 – 8 octombrie 2017, cu lucrarea intitulată "Conformational changes and protein content of sifted black rice flour fractions", **Carmen Bolea**, Camelia Vizireanu, Iuliana Aprodu, Leontina Grurgu-Grigore, Nicoleta Stănciu, Camelia Vizireanu.

Comunicări la conferințe naționale

1. Participare la Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG 2014, 15-16 mai 2014, **Carmen Bolea**, Camelia Vizireanu "Physico-chemical characterization of black rice used to obtain functional food".
2. Participare la Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG, 2015, 4 - 5 iunie 2015, **Carmen Bolea**, Camelia Vizireanu "The Impact of Thermal Treatment on Phenolic Content of Black Rice Anthocyanins".
3. Participare la Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG, 2016, 2 - 3 iunie 2016, **Carmen Bolea**, Nicoleta Stănciu, Camelia Vizireanu, "Thermal degradation effect on bioactive compounds from the black rice extracts (*Oriza sativa* L.)".
4. Participare la Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG, 2017, 8-9 iunie, **Carmen Bolea**, Camelia Vizireanu, "Functional Product for People with Food Intolerances".
5. Participare la Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din UDJ – Galați CSSD-UDJG, 2017, 8-9 iunie, **Carmen Bolea**, Turturică Mihaela, Livia Pătrașcu, Iuliana Banu, Nicoleta Stănciu, Iuliana Aprodu, "Investigation on the Stability of Soy Proteins under Different Processing Condition".

Brevet invenție

1. **Carmen Bolea**, Camelia Vizireanu, Romulus Burluc, Daniela Istrati. 2017. Compoziție de aluat pentru biscuiți aperitiv aglutenici. A/00158 și publicat online BOPI. nr. 9/2017. pag. 12.

Alte publicații

1. Iuliana Aprodu, **Carmen Alina Bolea**, Irina Ștefănescu, Iuliana Banu. 2017. Influence of tempering moisture on the milling potential of some cereals. The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology, 41(2), 21-30.