

Raport științific proiect PN-III-P1-1.1-PD-2021-0290 cu titlul Extracția și caracterizarea fizico-chimică a pectinei din subproduse din industria zahărului și utilizarea în paste fără gluten – etapa II

Rezumat

În cadrul acestei etape s-au studiat și optimizat condițiile de extracție a pectinei din tăiței de sfeclă de zahăr prin tehnica convențională de extracție cu acid citric și tehnici neconvenționale de extracție (extracția cu microunde și extracția cu ultrasunete în puls). S-a observat că influența condițiilor de extracție (temperatură, pH, raport solid-lichid și timp pentru extracția convențională; puterea microundelor, pH, raport solid-lichid și timp pentru extracția cu microunde; amplitudinea ultrasunetelor, pH, raport solid-lichid și timp pentru extracția cu ultrasunete în puls) asupra randamentului de pectină și conținutului de acid galacturonic a fost semnificativă. Optimizarea și validarea condițiilor de extracție a permis studierea proprietăților fizico-chimice ale pectinei. Pectina obținută prin extracție convențională cu acid citric a prezentat conținutul de acid galacturonic ridicat, gradul de metilare și acetilare mare și stabilitatea termică ridicată. Prin extracția cu microunde și extracția cu ultrasunete în puls s-a observat o creștere semnificativă a masei moleculare a pectinei. Considerând proprietățile fizico-chimice ale probelor, pectina extrasă din tăiței de sfeclă de zahăr a fost utilizată la dezvoltarea de noi produse alimentare prin încorporarea acesteia în compoziția pastelor făinoase fără gluten.

Descrierea științifică

Etapa 2 - Optimizarea extracției, caracterizarea fizico-chimică a pectinei obținute din tăiței de sfeclă de zahăr și studii preliminare asupra încorporării acesteia în paste făinoase fără gluten

Act 2.1 - Optimizarea condițiilor de extracție pentru metoda convențională de extracție cu acid citric, extracția cu microunde și extracția cu ultrasunete în puls

- Optimizarea condițiilor de extracție cu acid citric prin metodologia suprafeței de răspuns (RSM): pentru optimizarea efectului variabilelor independente, reprezentate de condițiile de extracție, asupra variabilelor dependente (randament de extracție și conținut de acid galacturonic) se utilizează un model experimental factorial Box-Behnken și metodologia suprafeței de răspuns.
- Optimizarea condițiilor de extracție cu microunde prin RSM: influența variabilelor independente implicate în proces (puterea microundelor, raport solid-lichid, pH și timp) asupra randamentului de extracție și conținutului de acid galacturonic (variabile dependente) este optimizată utilizând un model experimental factorial Box-Behnken și metodologia suprafeței de răspuns.
- Optimizarea condițiilor de extracție cu ultrasunete în puls prin RSM: efectul variabilelor independente, reprezentate de amplitudinea ultrasunetelor, temperatură, pH și timp, asupra variabilelor dependente (randament de extracție și conținut de acid galacturonic) este optimizat utilizând un model experimental factorial Box-Behnken și metodologia suprafeței de răspuns.

Materialul vegetal, respectiv tăiței de sfeclă de zahăr, utilizat în acest studiu a fost furnizat de o fabrică de procesare a sfeclei de zahăr din regiunea de nord-est, care face parte dintr-un grup care se numără printre cei mai mari producători de zahăr din sfeclă de zahăr din

Europa. Tăiței de sfeclă de zahăr au fost uscați în etuvă și apoi măcinați, înainte de procesul de extracție a pectinei.

Procedura de extracție și proiectarea experimentelor

Extracția convențională cu acid citric a fost realizată la temperaturi cuprinse între 80 și 100 °C, pH cuprins între 1 și 2, raport solid-lichid între 1:10 și 1:20 g/ml și timp de extracție care a fost variat între 60 și 180 min. În cazul extracției cu microunde a fost variată puterea microundelor (280-560 W), pH-ul (1-2), raportul solid-lichid (1:10-1:20 g/ml) și timpul de extracție (30-90 s). Pentru extracția cu ultrasunete în puls s-a utilizat o baie cu ultrasunete (temperatura de 60 °C) și a implicat varierea amplitudinii ultrasunetelor (60-100%), pH-ului (1-2), raportului solid-lichid (1:10-1:20 g/ml) și a timpului de extracție (20-60 min).

Fiecare extracție a fost efectuată prin aplicarea unui model experimental factorial Box-Behnken, care a fost elaborat astfel încât să cuprindă 4 parametri de extracție: pentru extracția convențională – temperatură, pH, raport solid-lichid și timp; extracția cu microunde – puterea microundelor, pH, raport solid-lichid și timp; extracția cu ultrasunete în puls – amplitudinea ultrasunetelor, pH, raport solid-lichid și timp. Acești parametri, considerați variabilele independente ale modelului, au fost variați pe 3 nivele. Astfel, modelul experimental Box-Behnken, care prezintă 4 factori și 3 nivele, a cuprins 30 de experimente (extracții) cu 5 repetiții în punctul central (nivelul 0 al variabilelor independente). Ca variabile dependente ale modelului au fost selectate randamentul de extracție și conținutul de acid galacturonic al pectinei.

Proiectarea și reprezentările grafice s-au realizat cu programul Stat-Ease 360 versiune trial (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Minnesota, Statele Unite ale Americii).

Metode de analiză

Randamentul de pectină a fost determinat în triplicat pentru fiecare metodă de extracție folosind formula:

$$\text{Randament de pectină (\%)} = \frac{m_0}{m} \times 100,$$

unde: m_0 – masa de pectină uscată, în g;

m – masa de tăiței de sfeclă de zahăr pretratați utilizată pentru extracție, în g.

Conținutul de acid galacturonic al pectinei a fost determinat în triplicat prin metoda cu reactiv sulfamat/*m*-hidroxidifenil dezvoltată de către Filisetti-Cozzi et al. (Melton & Smith, 2001). Pentru determinări s-a folosit spectrofotometrul UV-3600 Plus UV-Vis-NIR (Shimadzu Corporation, Japonia).

Rezultate și discuții

Studierea și optimizarea influenței condițiilor de extracție s-a realizat prin utilizarea unui model polinomial de ordin doi (pătratic), ales pe baza coeficientului de determinare (R^2), care a avut o valoare mai mare în comparație cu cea a modelelor liniar, cubic și 2FI (model al interacțiunii între doi factori), precum și pe baza valorii mici a lui p ($p < 0,05$).

Modelul a generat suprafețe de răspuns, care sunt reprezentări geometrice ale evoluției variabilelor dependente în funcție de cele independente (figura 2.1).

Rezultatele analizei de varianță (ANOVA) au demonstrat că modelul ales poate explica și prezice cea mai mare parte a variației randamentului de extracție și conținutului de acid galacturonic al pectinei obținute prin aplicarea celor trei metode de extracție.

Condițiile de extracție au fost optimizate astfel încât să rezulte simultan cele mai mari valori pentru randamentul de extracție și conținutul de acid galacturonic al pectinei. În final, fiecare extracție a fost repetată în triplicat în condițiile optime prezise, iar pe baza rezultatelor similare obținute s-au validat condițiile de extracție generate de designul experimental de tip Box-Behnken.

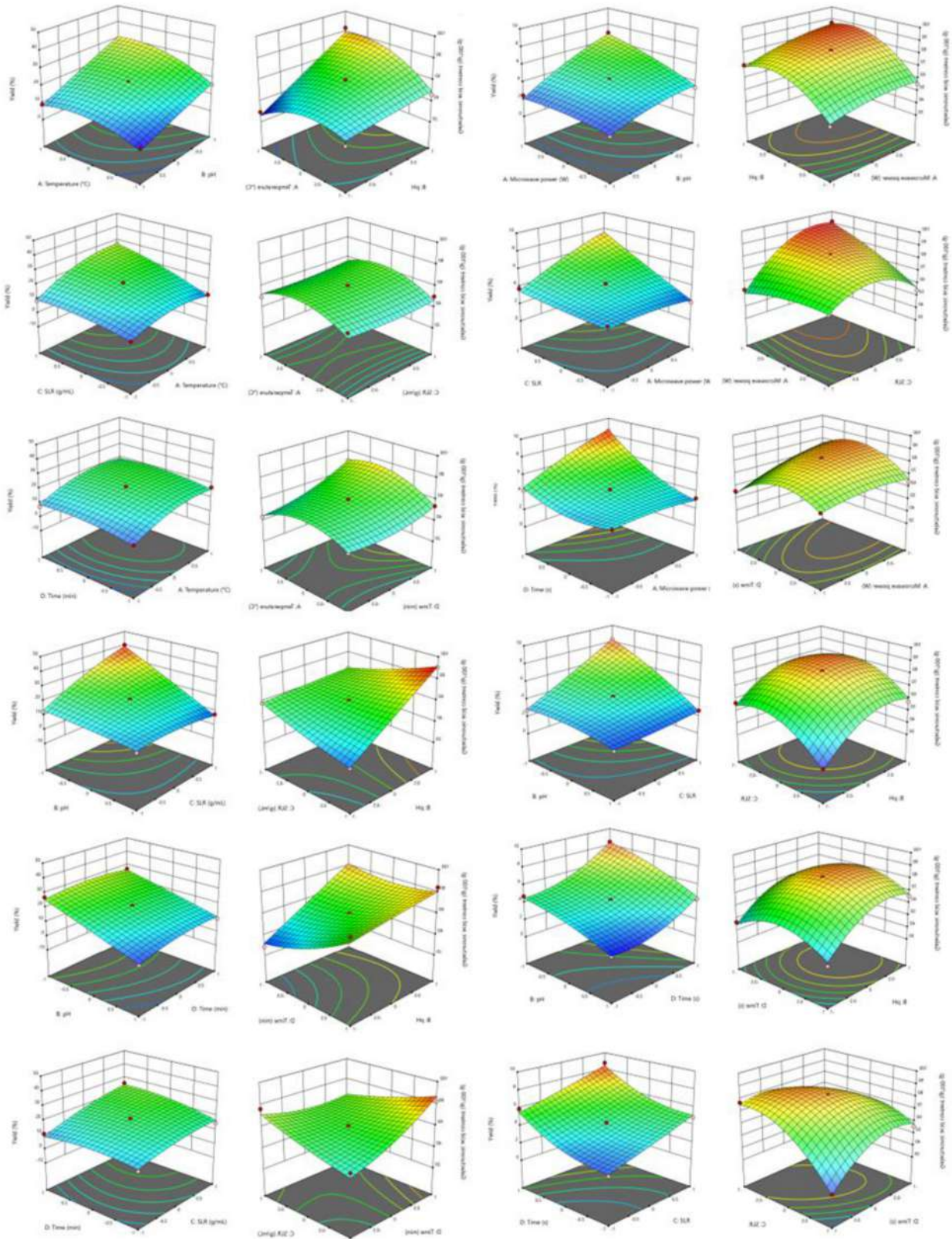


Figura 2.1. Reprezentare grafică 3D (suprafețe de răspuns) a influenței condițiilor de extracție asupra randamentului de extracție și conținutului de acid galacturonic al pectinei obținute din tăiței de sfeclă de zahăr prin metode convenționale și neconvenționale de extracție

Concluzii

Influența condițiilor de extracție (temperatură, pH, raport solid-lichid și timp pentru extracția convențională; puterea microundelor, pH, raport solid-lichid și timp pentru extracția cu microunde; amplitudinea ultrasunetelor, pH, raport solid-lichid și timp pentru extracția cu ultrasunete în puls) asupra randamentului de pectină și conținutului de acid galacturonic a fost semnificativă. Optimizarea condițiilor de extracție a permis studierea proprietăților pectinei.

Act 2.2 - Caracterizarea fizico-chimică a pectinei extrase prin metode convenționale și neconvenționale din tăiței de sfeclă de zahăr

- Determinarea conținutului de acid galacturonic prin metoda spectrofotometrică, a compoziției de monoglucide prin metoda cromatografică, gradului de metilare și acetilare al pectinei prin metoda HPLC și a masei moleculare prin HPLC-RID.
- Analiza stabilității termice a pectinei din tăiței de sfeclă de zahăr prin calorimetrie cu scanare diferențială utilizând un calorimetru DSC 25.
- Comparatie între pectina din tăiței de sfeclă de zahăr și pectina comercială din citrice și din mere pe baza proprietăților fizico-chimice.

Acidul galacturonic este principalul component structural principal al pectinei, astfel că determinarea conținutului de acid galacturonic constituie o etapă importantă și esențială a analizei structurii chimice a pectinei. După acidul galacturonic, galactoza, arabinoza, ramnoza, xiloza și manoză sunt monoglucide care pot fi identificate în compoziția pectinei și oferă informații cu privire la componența pectinei (regiunea „netedă” a homogalacturonanului și regiunea puternic ramificată a ramnogalacturonanului) și puritatea acesteia. Gradul de metilare și cel de acetilare și masa moleculară sunt parametri cu influență majoră asupra calității pectinei și a aplicațiilor sale în industria alimentară. Aplicațiile pectinei în industria alimentară se stabilesc, de asemenea, pe baza proprietăților termice, care pot fi determinate prin calorimetrie cu scanare diferențială. Nu în ultimul rând, spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) este o metodă rapidă și utilă de analiză a grupărilor funcționale ale pectinei. Toate aceste metode au fost aplicate în analiza comparativă a proprietăților fizico-chimice ale pectinei extrase din tăiței de sfeclă de zahăr și ale pectinei comerciale din citrice și din mere.

Metode de analiză

Determinarea conținutului de acid galacturonic al pectinei a fost efectuată prin metoda prezentată pentru activitatea 1.1.

Compoziția de monoglucide a fost determinată în triplicat prin metoda HPLC descrisă anterior (Yang et al., 2005), conform unei proceduri care implică hidroliza probelor în monoglucidele componente, formarea unor compuși ai monoglucidelor cu 1-fenil-3-metil-5-pirazolonă și cuantificarea acestor compuși utilizând un sistem HPLC echipat cu o coloană Zorbax Eclipse Plus C18 (150 × 4,6 mm, diametru de 5 μm; Agilent Technologies, California, Statele Unite ale Americii) și cuplat cu un detector UV SPD-M-20A (Shimadzu, Kyoto, Japonia) (Dranca et al., 2021).

Gradul de metilare și acetilare al pectinei a fost determinat în triplicat printr-o metodă HPLC (Levigne et al., 2002). Cuantificarea a fost realizată cu un sistem HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonia) echipat cu o coloană C18 (250 × 4,6 mm, diametru de 5 μm; Phenomenex, California, Statele Unite ale Americii) și cuplat cu un detector de indice de refracție RID-10A (Shimadzu, Kyoto, Japonia).

Masa moleculară medie a pectinei a fost determinată în triplicat prin cromatografie de excludere utilizând un sistem HPLC echipat cu o coloană Yarra 3μm SEC-2000 (300 × 7,8 mm; Phenomenex, California, Statele Unite ale Americii) cu cartuș de protecție KJ0-4282

SecurityGuard (Phenomenex, California, Statele Unite ale Americii) și cuplat cu un detector de indice de refracție RID-10A (Dranca et al., 2020).

Spectrul FT-IR al probelor de pectină a fost obținut în modul transmisie în domeniul de numere de undă 4000-400 cm^{-1} și o rezoluție de 4 cm^{-1} .

Analiza termică a fost efectuată în triplicat utilizând tehnica calorimetriei cu scanare diferențială. Proba de pectină a fost cântărită și apoi închisă ermetic într-un creuzet care a fost introdus în instrumentul de analiză DSC 25 (TA Instruments, Delaware, Statele Unite ale Americii) împreună cu un creuzet gol utilizat ca referință. Măsurătorile au fost efectuate în domeniul de temperatură 0-300 $^{\circ}\text{C}$, prin încălzire constantă cu 10 $^{\circ}\text{C}/\text{minut}$, folosind azot ca gaz de purjare la un debit de curgere de 20 ml/min.

Rezultate și discuții

Rezultatele obținute pentru conținutul de acid galacturonic al pectinei, compoziția de monoglucide neutre, gradul de metilare și acetilare și masa moleculară sunt prezentate grafic în figura 2.2. Metodele de extracție utilizate la obținerea pectinei din tăiței de sfeclă de zahăr au fost codate în grafice, după cum urmează: extracție convențională cu acid citric – EC, extracție cu microunde – EM, extracție cu ultrasunete în puls – EUP.

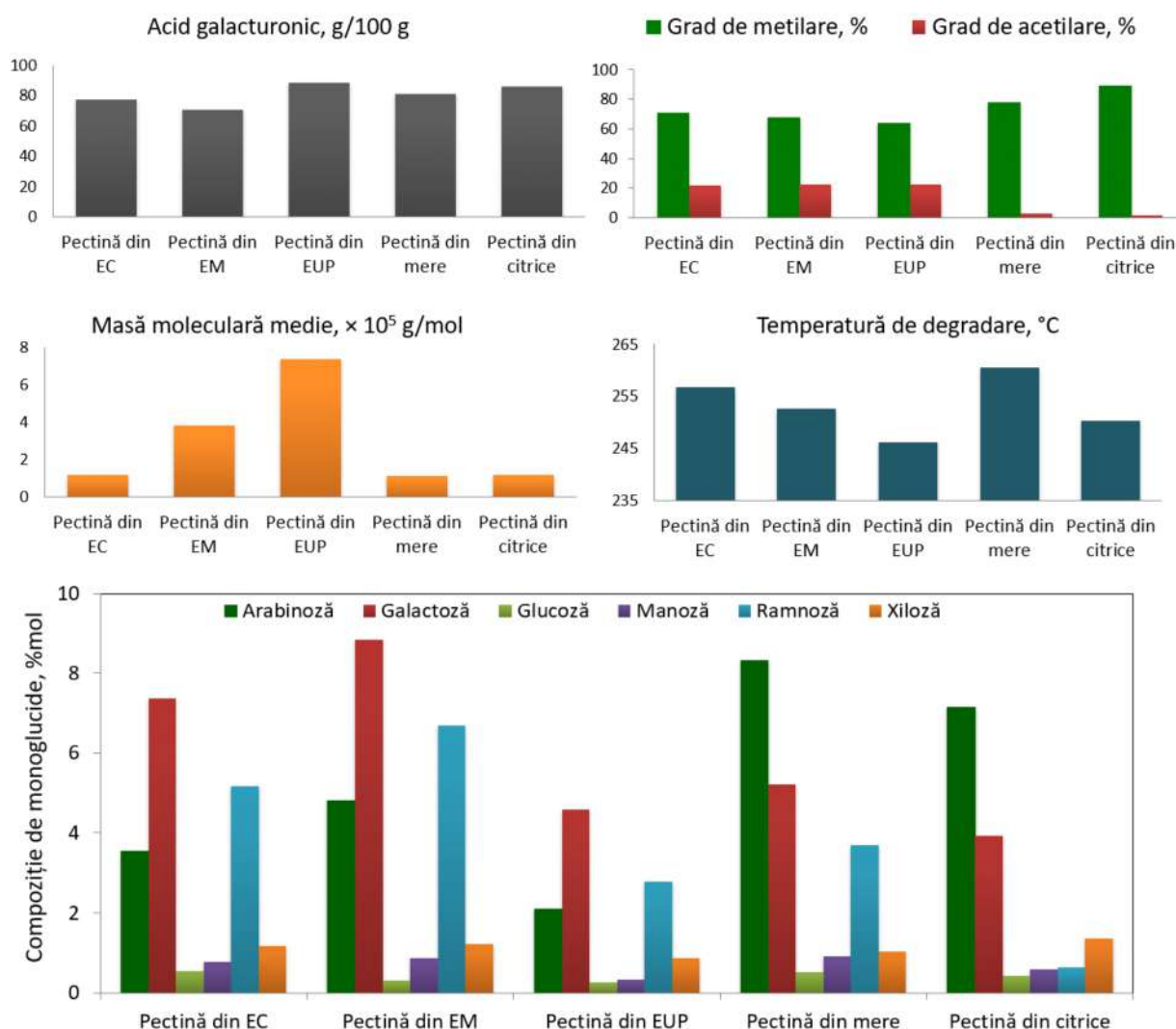


Figura 2.2. Proprietățile fizico-chimice ale pectinei extrase din tăiței de sfeclă de zahăr și a probelor de pectină comercială

Compoziția pectinei din tăiței de sfeclă de zahăr este constituită în principal din acid galacturonic, galactoză, ramnoză și arabinoză. Principala diferență între probele de pectină a fost conținutul de acid galacturonic, care a fost mai mare în pectină extrasă cu ultrasunete în puls. Toate probele au fost considerate înalt metilate deoarece gradul de metilare a depășit 60%. Masa moleculară a pectinei extrase prin tehnicile neconvenționale a fost de peste două ori mai mare decât masa moleculară a pectinei extrase prin metoda convențională. Comportamentul termic al probelor de pectină din tăiței de sfeclă de zahăr a fost similar, indiferent de metoda de extracție utilizată și a fost comparabil cu cel al pectinei comerciale, ceea ce confirmă faptul că acest tip de pectină este stabil și potrivit pentru aplicații care implică prelucrare termică la temperaturi ridicate.

Concluzii

Pectina obținută prin extracție convențională cu acid citric a prezentat conținut de acid galacturonic ridicat, gradul de metilare și acetilare mare și stabilitatea termică ridicată. S-a observat o îmbunătățire pentru masa moleculară determinată de aplicarea metodelor neconvenționale de extracție. În contextul unei piețe comerciale afectată de cererea în creștere, tăiței de sfeclă de zahăr pot fi considerați o sursă potrivită de pectină, iar valorificarea acestui produs secundar în producția de pectină poate contribui la economia regională.

Act 2.3 - Stabilirea celui mai bun raport făină fără gluten:pectină din tăiței de sfeclă de zahăr pentru prepararea pastelor făinoase

- Selectarea făinii fără gluten și a cantității de pectină utilizată pentru prepararea pastelor făinoase: determinarea proprietăților reologice ale aluatului – vâscozitate, modul de elasticitate (G') și modul vâscozitate (G'') utilizând un reometru dinamic Thermo HAAKE model MARS 40 și prelucrarea statistică a datelor experimentale pentru evidențierea diferențelor determinate de proporția de pectină adăugată în compoziția aluatului pentru paste făinoase fără gluten.
- Optimizarea raportului făină fără gluten:pectină din tăiței de sfeclă de zahăr.
- Comparatie între pastele făinoase fără gluten care conțin pectină din tăiței de sfeclă de zahăr și pastele făinoase fără gluten preparate cu pectină comercială din punctul de vedere al proprietăților reologice ale aluatului și proprietăților termice ale pastelor făinoase.

În ultimele decenii, pastele făinoase fără gluten au fost consumate nu numai de către persoanele diagnosticate cu boală celiacă, dar și de persoanele care doresc să excludă din alimentație produsele pe bază de gluten din motive de sănătate. Printre componentele de bază utilizate pentru obținerea pastelor făinoase fără gluten se numără făina și/sau amidonul din porumb, făina de orez, făina obținută din pseudocereale, alături de adăugarea de proteine, gume și emulgatori care pot acționa parțial ca înlocuitori de gluten. Hidrocoloizi precum carboximetil-celuloza, pectina și agarul se adaugă, de asemenea, în compoziția pastelor făinoase fără gluten pentru a îmbunătăți textura și gustul produsului.

Metode de analiză

Pentru optimizarea compoziției pastelor făinoase fără gluten s-au utilizat trei tipuri de făină – făină de orez, făină de mei și făină de quinoa și diferite concentrații de pectină (1-3%). Probele au fost caracterizate prin analiza proprietăților reologice ale aluatului și determinarea proprietăților termice (calorimetrie de scanare diferențială) ale pastelor făinoase. Pentru comparație, s-au pregătit probe de paste făinoase fără gluten preparate cu aceleași proporții de pectină comercială. Determinarea vâscozității, modulului de elasticitate (G') și modulului

vâscozitate (G'') s-a realizat conform unor proceduri descrise anterior (Ungureanu-Iuga et al., 2020).

Datele experimentale au fost interpretate statistic pe baza rezultatelor analizei de varianță (ANOVA) utilizând softul de prelucrare Statgraphics Centurion XVI (Manugistics Corp., Rockville, Maryland, Statele Unite ale Americii). Testul Fisher LSD (LSD – least significant difference) a fost aplicat la un nivel de încredere de 95%.

Rezultate și discuții

Prin determinările efectuate s-a observat că adăugarea de pectină în paste făinoase fără gluten determină modificări ale proprietăților reologice ale aluatului în principal din cauza modificărilor în ceea ce privește gelatinizarea amidonului, solubilizarea pectinei, precum și a interacțiunilor amidon-pectină. S-au observat diferențe între probele analizate care au fost determinate atât de tipul de făină utilizat, cât și de proporția de pectină adăugată. Analiza prin calorimetrie cu scanare diferențială a evidențiat peak-uri endoterme corespunzătoare eliminării apei din probe și peak-uri exoterme care au indicat degradarea probelor de paste făinoase la temperaturi ridicate.

Concluzii

Prin cercetările efectuate în această etapă s-a optimizat raportul făină fără gluten:pectină din tăiței de sfeclă de zahăr în vederea obținerii de paste făinoase fără gluten. Analiza comparativă între pastele făinoase fără gluten care conțin pectină din tăiței de sfeclă de zahăr și pastele făinoase fără gluten preparate cu pectină comercială a indicat diferențe în ceea ce privește proprietățile reologice ale aluaturilor pentru paste și proprietățile termice ale probelor de paste făinoase.

Referințe bibliografice

- [1] Dranca, Florina, Talón, E., Vargas, M., & Oroian, M. (2021). Microwave vs. conventional extraction of pectin from *Malus domestica* 'Fălticeni' pomace and its potential use in hydrocolloid-based films. *Food Hydrocolloids*, 121, 107026. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107026>
- [2] Dranca, F., Vargas, M., & Oroian, M. (2020). Physicochemical properties of pectin from *Malus domestica* 'Fălticeni' apple pomace as affected by non-conventional extraction techniques. *Food Hydrocolloids*, 100. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105383>
- [3] Levigne, S., Thomas, M., Ralet, M. C., Quemener, B., & Thibault, J. F. (2002). Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards. *Food Hydrocolloids*, 16(6), 547–550. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00015-2)
- [4] Melton, L. D., & Smith, B. G. (2001). Determination of the Uronic Acid Content of Plant Cell Walls Using a Colorimetric Assay. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), E3.3.1-E3.3.4. <https://doi.org/10.1002/0471142913.fae0303s00>
- [5] Ungureanu-Iuga, M., Dimian, M., & Mironeasa, S. (2020). Development and quality evaluation of gluten-free pasta with grape peels and whey powders. *LWT*, 130, 109714. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109714>
- [6] Yang, X., Zhao, Y., Wang, Q., Wang, H., & Mei, Q. (2005). Analysis of the monosaccharide components in *Angelica* polysaccharides by high performance liquid chromatography. *Analytical Sciences*, 21(10), 1177–1180. <https://doi.org/10.2116/analsci.21.1177>

Act 3.3 - Managementul proiectului, achiziția de materiale și echipamente necesare și diseminarea rezultatelor cercetărilor

- Managementul proiectului.
- Achiziția de materiale și echipamente în conformitate cu legislația națională.
- Diseminarea rezultatelor cercetărilor – prezentarea unei lucrări științifice la o conferință internațională și publicarea a 2 articole științifice în reviste cotate ISI Q1/Q2.

În această etapă au fost achiziționate următoarele echipamente: densitometru McFarland DEN-1, miniPC industrial, kit Agitator magnetic cu încălzire DLAB MS-H280-PRO și un rotaevaporator cu condensor vertical RVO 400 echipat cu pompă de vacuum KNF 309577/026366. Echipamentele au fost utilizate în activitățile cuprinse în etapa II a proiectului. De asemenea, s-au achiziționat materiale consumabile necesare în activitatea desfășurată în cadrul proiectului.

Rezultatele obținute în această etapă au fost diseminate în 2 articole științifice în proces de evaluare la două reviste indexate ISI Q1 și prin prezentarea a 3 lucrări științifice la conferințe internaționale din țară și străinătate:

1. “Waste management in the sugar industry: study of pectin extraction from sugar beet flakes by conventional and non-conventional techniques”, autori Florina Dranca și Silvia Mironeasa, la RETASTE: Rethink Food Resources, Losses, and Waste, manifestare științifică care s-a desfășurat în Atena, Grecia, în perioada 27-29 septembrie 2023.
2. “Physicochemical properties of pectin from sugar beet flakes as affected by extraction method”, autori Florina Dranca și Silvia Mironeasa, la SGEM GeoConference – “Green Science for Green Life, manifestare științifică care s-a desfășurat în Viena, Austria, în perioada 28 noiembrie – 1 decembrie 2023.
3. “Waste management in the sugar industry: study of pectin extraction from sugar beet flakes by conventional and non-conventional techniques”, autori Florina Dranca și Silvia Mironeasa, la 9th Edition of the International Conference Biotechnologies, Present and Perspectives, manifestare științifică care s-a desfășurat în Suceava, România, în data de 15 decembrie 2023.

Siteul proiectului este actualizat și poate fi consultat la adresa:

<https://fia.usv.ro/cercetare/sugarbeetpec/>

Toate activitățile asumate în cadrul etapei II a proiectului au fost realizate.

Director de proiect,

Șef lucrări univ. dr. ing. Florina DRANCA

