Stadiul actual si rezultatele obtinute in etapa 1

Raportul stiintific si tehnic in extenso prezinta activitatile corespunzatoare fiecarui partener conform planificarii acestora.

Activitatea 1.1 Studiu privind perspectivele consumatorilor pentru identificarea obiceiurilor de consum si a necesitatii unui supliment nutritiv lichid (AROMA)

Piata suplimentelor lichide si a bauturilor functionale este in crestere rapida, sustinuta de interesul consumatorilor pentru produse naturale, convenabile si cu beneficii clare asupra sanatatii. Formatele dominante sunt shot-urile functionale, bauturile ready-to-drink, siropurile dozabile si stick-urile solubile, iar tendinta majora este orientarea catre formule clean-label, pe baza de ingrediente vegetale si fara aditivi sintetici.

In pofida diversitatii actuale, multe produse sunt monofunctionale, dependente de matrici lactate sau pulberi procesate, si contin cantitati reduse de compusi biologic activi. Brandurile vegetale existente raspund partial cererii, dar nu acopera integral nevoile legate de imunitate sau protectia antioxidanta.

In acest context, LiProMush propune un produs multifunctional, lichid si cu eticheta curata, obtinut din resurse locale prin hidroliza enzimatica si extractie cu apa subcritica. Formula combina hidrolizate proteice din turte de chimen negru si armurariu cu extracte din biomasa de ciuperci, bogate in polizaharide si polifenoli. Aceasta abordare sustenabila maximizeaza valoarea nutritionala si ofera beneficii integrate pentru imunitate, recuperare si starea generala de bine.

Analiza pietei arata ca segmentul suplimentelor lichide este dominat de companii globale cu portofolii extinse, dar dependente de materii prime importate si lanturi de aprovizionare lungi. Brandurile vegetale precum Huel, OWYN sau Soylent ofera produse pe baza de proteine din plante, insa functionalitatea lor este limitata, iar formulele contin frecvent stabilizatori si ingrediente procesate.

Analiza portofoliilor disponibile pe piata romaneasca arata o dominanta clara a suplimentelor in forma lichida, in special in categoriile dedicate colagenului si vitaminelor, datorita absorbtiei rapide si pozitionarii premium promovate de branduri precum *Swedish Nutra* si *Marnys*. Produsele sunt adaptate diferitelor segmente generationale, incluzand formule pentru imunitate, par si ten destinate seniorilor (Gradina Sanatatii, Secom), dar si suplimente pentru performanta sportiva sau nutritie pediatrica (Marnys).

Formularea acestor suplimente pune accent pe compusi bioactivi functionali, precum colagenul combinat cu acid hialuronic, complexele antioxidante sau ingredientele cu efect de relaxare si regenerare celulara. Se remarca, de asemenea, o diversitate ridicata a formatelor de prezentare – sticlute, fiole, shot-uri – si o claritate crescuta a beneficiilor comunicate, adaptate nevoilor specifice ale consumatorilor: relaxare, mobilitate, imunitate, controlul greutatii sau sustinerea performantei fizice.

Tendinta pietei evidentiaza o orientare constanta catre formule clean-label, multifunctionale si usor de administrat, care imbina naturaletea ingredientelor cu eficienta functionala si sunt aliniate stilului de viata modern si preferintelor pentru produse cu valoare nutritionala ridicata.

Pentru investigarea motivatiilor de consum, barierelor si asteptarilor asociate suplimentelor nutritive lichide, a fost realizat un studiu calitativ utilizand metodologia focus-grupurilor. Aceasta abordare a permis explorarea opiniilor directe ale consumatorilor, oferind informatii valoroase dincolo de datele cantitative.

Focus-grupul a evidentiat un consumator care prioritizeaza suplimentele lichide datorita biodisponibilitatii crescute si eficientei percepute fata de formele solide. Intentia de achizitie este modulata predominant de factori senzoriali (gust, aroma, textura), parametri economici (pret) si claritatea comunicarii beneficiilor functionale, preferandu-se formulatiile clean-label, cu ingrediente naturale si fara excipienti inutili.

Participanții au indicat necesitatea unor caracteristici senzoriale optimizate (profil aromatic natural, note fructate/citrice, textura omogena fara agenti de texturare). De asemenea, ambalajul trebuie sa fie ergonomic, sustenabil si adaptat formatului unic doza (“shot”), facilitand utilizarea si alinierea la principiile eco-designului.

Pentru completarea analizei calitative, a fost realizat un chestionar online adresat consumatorilor, utilizand platforma Google Forms pentru investigarea perceptiilor si obiceiurilor de

consum in raport cu suplimentele nutritive lichide, precum si evaluarea potentialului de acceptare a unor concepte inovative bazate pe hidrolizate proteice din chimen si armurariu.

Chestionarul a fost distribuit online, pe retele sociale, comunitati de interes (sanatate, sport, nutritie), precum si prin parteneri comerciali si canale digitale. Raspunsurile au fost colectate anonim, pe un esantion de 121 de respondenti, cu varste peste 18 ani, pentru a asigura relevanta statistica. Timpul mediu de completare a fost de aproximativ 10–12 minute.

Activitatea 1.2 Caracterizarea fizico-chimica a substraturilor proteice (turte de chimen negru si armurariu) (AROMA)

Analiza fizico-chimica au evidentiat diferente semnificative intre cele doua tipuri de turte, atat in ceea ce priveste compozitia proteica, lipidica, cat si continutul mineral (cenusa).

Turtele de chimen negru au prezentat un continut ridicat de lipide (27,34%), ceea ce a indicat prezenta unei cantitati semnificative de ulei rezidual, caracteristica tipica subproduselor obtinute dupa presarea semintelor oleaginoase cu continut mare de grasimi. Continutul de proteine totale (20,9%) a fost superior comparativ cu cel al turtelor de armurariu, reprezentand o sursa valoroasa de azot organic. Valoarea cenusii (4,52%) a reflectat un nivel moderat de compusi minerali, iar prezenta carbohidratilor, determinata calitativ, a completat profilul nutritional complex al acestora.

In cazul turtelor de armurariu, continutul de proteine totale (18,80%) a fost usor inferior, dar a ramas semnificativ. Continutul de lipide (11,58%) a fost mult mai redus comparativ cu cel al turtelor de chimen negru. Valoarea cenusii (5,70%) a fost usor mai mare, ceea ce a sugerat o concentratie mai ridicata de elemente minerale. Ambele tipuri de turte s-au caracterizat printr-un continut scazut de umiditate (sub 7%), aspect care a fost favorabil conservarii si stabilitatii in timp.

Activitatea 1.3 Dezvoltarea si optimizarea procesului de hidroliza enzimatica (ICECHIM)

Hidroliza enzimatica reprezinta o metoda avansata, eficienta si sustenabila de valorificare a substraturilor proteice obtinute din subproduse agroindustriale, precum turtele de chimen negru (Nigella sativa) si armurariu (Silybum marianum). Procesul implica scindarea controlata a proteinelor complexe in peptide cu masa moleculara redusa si aminoacizi liberi, prin actiunea unor enzime proteolitice specifice. Alegerea enzimei adecvate si optimizarea conditiilor operationale constituie factori critici pentru obtinerea unui profil de peptide bioactive cu proprietati functionale superioare.

In vederea selectarii enzimei sau a combinatiilor de enzime pentru procesul de hidroliza a substraturilor proteice, au fost derulate experimente comparative utilizand doua categorii de enzime: enzime comerciale cu specificitate proteolitica si enzime microbiene cu scopul evaluarii performantelor catalitice ale fiecarei enzime, individual si in combinatie, in vederea selectarii enzimei/combinatiilor de enzime pe baza gradului de hidroliza obtinut.

Hidroliza enzimatica in doua etape a fost initiata prin adaugarea primei enzime, mentinandu-se parametrii specifici de activitate — pH, temperatura si timp de incubare — corespunzatori acesteia. Dupa finalizarea primei etape, conditiile de reactie au fost ajustate pentru a corespunde cerintelor optime ale celei de-a doua enzime, care a fost ulterior adaugata pentru completarea procesului de hidroliza si obtinerea unui spectru extins de peptide. Raportul enzima–substrat a fost calculat in functie de continutul proteic determinat pentru fiecare tip de substrat. Pe durata reactiei, pH-ul a fost mentinut constant prin corectii periodice cu solutii de NaOH 2 M sau HCl 1 M. Procesul de hidroliza enzimatica a fost incheiat prin inactivarea termica a enzimelor, prin cresterea temperaturii la 90 °C timp de 15 minute, urmata de racire rapida pe baie de gheata. Hidrolizatele obtinute au fost ulterior centrifugate la 9000 rpm, timp de 10 minute, pentru separarea fractiei solubile de reziduurile solide.

Fractia solubila obtinuta in urma centrifugarii a fost utilizata pentru determinarea gradului de hidroliza DH(%), indicator al eficientei clivajului legaturilor peptidice si al nivelului de peptide si aminoacizi liberi generati in timpul tratamentului enzimatic. Determinarea s-a realizat prin metoda azotului neproteic, care presupune precipitarea proteinelor nehidrolizate cu acid tricloracetic (TCA) 10%. Pentru fiecare proba, 10 mL de hidrolizat proteic au fost amestecati cu 10 mL solutie TCA 10%, mentinuti in repaus timp de 30 minute, apoi centrifugati timp de 10 minute la 9000 rpm. Continutul de azot din supernatant si cel total din substrat au fost determinate prin metoda Kjeldahl modificata, iar gradul de hidroliza a fost calculat.

Optimizarea procesului de hidroliza enzimatica a urmarit obtinerea unor hidrolizate proteice cu gust redus de amar, prin controlul gradului de hidroliza. Gustul amar apare preponderent la peptidele scurte si hidrofobe, care se formeaza in cantitate mai mare atunci cand hidroliza este avansata. Proteinele mari (>10 kDa) si peptidele medii (1–10 kDa) prezinta un gust neutru sau usor umami,

intrucat sunt prea voluminoase pentru a interactiona eficient cu receptorii gustativi. In schimb, oligopeptidele cu mase moleculare sub 1 kDa (≈ 2–10 aminoacizi), in special cele hidrofobe, confera o amareala pronuntata, iar di- si tri-peptidele pot fi fie amare. In hidrolizatele enzimatice, aceste peptide de dimensiuni mici se regasesc in mod natural in supernatantul TCA, iar proportia lor depinde de enzima utilizata, gradul de hidroliza si natura proteinei de plecare. Un grad redus de hidroliza (GH < 8%) permite obtinerea unui echilibru intre solubilitate si palatabilitate, favorizand formarea peptidelor medii (1–10 kDa) cu gust neutru sau usor umami.

Pentru obtinerea unui grad de hidroliza potrivit si obtinerea unui profil de peptide bioactive cu valoare nutritionala si functionala ridicata, procesul de hidroliza enzimatica a proteinelor din turtele de chimen negru a fost optimizat prin utilizarea metodologiei suprafetei de raspuns, pe baza unui plan experimental. Au fost selectati trei factori principali de influenta asupra hidrolizei enzimatice secventiale a proteinelor din turtele de chimen negru si armurariu: concentratia enzimei utilizate in prima etapa a hidrolizei, concentratia enzimei aplicate in a doua etapa si timpul total de hidroliza, raportat la desfasurarea celor doua etape enzimatice. Acesti parametri au fost variati sistematic pe trei niveluri, in vederea evaluarii atat a efectelor individuale, cat si a interactiunilor dintre acestia asupra DH.

Activitatea 1.4 Caracterizarea fizico-chimica si functionala a hidrolizatelor proteice (ICECHIM)

Profilul aminoacizilor rezultati in urma hidrolizei a fost analizat prin GC–MS, utilizand derivatizarea cu MTBSTFA pentru cresterea volatilizarii compusilor. Procedura analitica a inclus extractia cu HCl 0,1 N, deproteinizarea cu acetonitril si derivatizarea la 100 °C timp de 3 ore. Separarea cromatografica a fost realizata pe o coloana capilara Elite-5MS, iar identificarea calitativa a aminoacizilor s-a bazat pe compararea spectrelor de masa cu biblioteca NIST si monitorizarea selectiva a ionilor caracteristici in modul SIM.

Caracterizarea functionala a hidrolizatelor proteice obtinute a evidentiat proprietati distincte. Hidrolizatul proteic obtinut din turte de chimen negru a prezentat o solubilitate ridicata (78%), evidentiind o buna dispersibilitate in medii apoase. Capacitatea de legare a apei a fost moderata (0,84 g/g), confirmand faptul ca fractiile proteice rezultate au interactionat intr-o masura limitata cu apa. Proprietatile emulsifiante au fost reduse, capacitatea de emulsifiere (4,61%) si stabilitatea emulsiei (1,53%) evidentiind o eficienta limitata in structuri ulei–apa. Capacitatea de spumare a fost foarte ridicata (142,72%), aspect ce reflecta prezenta peptidelor cu activitate pronuntata la interfata aer–apa, capabile sa incorporeze rapid aerul. Stabilitatea spumei a fost buna (61,79%), demonstrand mentinerea structurii spumei pentru un interval rezonabil de timp. Stabilitatea termica a fost relativ ridicata (83%), sugerand ca hidrolizatul si-a mentinut structura functionala la temperaturi crescute. pH-ul produsului a fost usor alcalin, avand valoarea 7,65, favorabila stabilitatii peptidelor solubile.

In ceea ce priveste hidrolizatul proteic obtinut din turte de armurariu, acesta a prezentat o solubilitate mai redusa (32%), aspect ce a indicat o proportie mai mare de peptide sau agregate proteice cu caracter hidrofob. Capacitatea de legare a apei a fost mai ridicata (2,56 g/g), sugerand ca fractiile proteice rezultate au avut o afinitate crescuta pentru moleculele de apa datorita prezentei unor structuri cu densitate mai mare de grupari polare si a unei matrice proteice capabile sa retina cantitati importante de apa. Proprietatile emulsifiante au fost mai ridicate, capacitatea de emulsifiere (35,29%) si stabilitatea emulsiei (17,65%) au indicat prezenta unor peptide amfifile eficiente, capabile sa se fixeze rapid la interfata ulei–apa si sa stabilizeze emulsia prin formarea unui film protector. Capacitatea de spumare a fost mai redusa (47,62%), evidentiind o activitate interfaciala mai scazuta si o dinamica mai lenta de incorporare a aerului la interfata aer–apa. Stabilitatea spumei a fost crescuta (74,19%), demonstrand formarea unei structuri interfaciale mai robuste si mai rezistente la colaps, capabile sa mentina spuma pentru intervale de timp extinse. Stabilitatea termica a fost ridicata (91%), sugerand o rezistenta sporita la denaturarea termica si mentinerea functionalitatii peptidelor la temperaturi mai mari. pH-ul produsului a fost usor alcalin (7,52), comparabil cu cel al hidrolizatului din chimen negru, favorabil solubilitatii si stabilitatii peptidelor obtinute.