СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ
ИНСТИТУТ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ И РАЗВИТИЕ НА ХРАНИТЕ

Здравко Кралчев Манев

ЕКСТРАКЦИЯ И ХИМИЧНА МОДИФИКАЦИЯ НА АЛГИНАТИ ОТ МОРСКИ ВОДОРАСЛИ И ПРИЛОЖЕНИЕТО ИМ В ХРАНИТЕЛНАТА ПРОМИШЛЕНОСТ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР”
по научна специалност
02.11.15. « Технология на плодовите и зеленчукови консерви »

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

доц. д-р Данка Петева Луднева
проф. д-р. Пантелей Петров Денев

НАУЧНО ЖУРИ:

1. проф. д-р Павлина Параскова
2. проф. д-р Васил Карагьозов
3. доц. д-р Данка Луднева
4. доц. д-р Николай Кирчев
5. доц. д-р Кирил Михалев

Пловдив, 2015

Дисертационният труд е написан на 149 стандартни машинописни страници и съдържа 21 таблици, 30 фигури и 6 снимки. Цитирани са 178 литературни източника, от които 7 на кирилица и 175 на латиница.

Използваната номерация на таблиците и фигурите не съответства на номерацията в дисертацията.

Автор: Здравко Кралчев Манев

Заглавие: Екстракция и химична модификация на алгинати от морски водорсли и приложението им в хранителната промишленост

УВОД

В природата са известни над 1400 вида кафяви водорасли. Те се срещат в Черно, Саргасово и Средиземно море по крайбрежните ивици на различна дълбочина. Кафявите морски водорасли са източници на ценни органични и минерални вещества, които са свързани в комплексни съединения, в т. ч. и в биологично активни вещества. Съдържат алгинова киселина, целулоза, ламинарин, манитол, полифеноли и др. Богати са на протеини, липиди и витамин К. Кафявите морски водорасли са най-голям източник на мастноразтворимия витамин К, който е необходим за нормалното кръвосъсирване. Минералният състав на водораслите е богат и разнообразен, като се срещат най-различни микро и макроелементи. Поради способността на кафявите водорасли да акумулират тежки метали, при наличието им във водата те могат да се използват като биомаркери за тестване чистотата на екосистемите, които обитават.

Наличието на структурни полизахариди, като алгинова киселина, целулоза и др. имат способността да набъбват и да създават чувство на ситост, поради което кафявите морски водорасли се използват в диетите при намаляване на телесното тегло. Алгиновата киселина и нейните соли (натриев, калциев и калиев алгинати) са едни от най-ценните химични субстанции в кафявите водорасли. Натриевият алгинат е водоразтворима сол, която може в присъствието на калциеви йони да желира, като се получават калциеви желета. Алгинатите (натриев алгинат) намират приложение при производството на желета за диабетици и хора с наднормено тегло. Използват се и като емулгатори и стабилизатори на белтъчна пяна при бира, нектари, кондензирано мляко и др. хранителни продукти.

Обект на настоящото научно изследване са кафявите морски водорасли от *семейство Cystoseiraceae* – вид *Cystoseira barbata*, които са разпространени в различни райони на нашето Черноморие и е известно, че съдържат алгинова киселина

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационната работа е изолиране, характеризиране и анализиране на получената алгинова киселина от кафяви морски водорсли *Cystoseira barbata.* Химична модификация на алгинова киселина и приложение на алгинатите в хранителната промишленост.

За реализирането на поставената цел са формулирани следните ***задачи:***

1. Физична и химична характеристика на кафяви морски водорасли *Cystoseira barbata* от различни райони на Черно море.

2. Разработване на методи за екстракция на алгинова киселина от кафяви морски водорасли *Cystoseira barbata* и възможности за оптимизация на процеса.

3. Химична модификация на алгинова киселина − получаване на метилалгинат; алгинамид и алгинилсукцинат.

4. Определяне на микробна инхибираща активност на получените алгинови деривати.

5. Приложение на получените алгинати в хранителната промишленост.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ

1. Суровини - кафяви водорасли

Средна проба на кафявите морски водорасли *Cystoseira barbata* е взета по метода на квадратите (Kalugina- Gutnik, 1975) от нос св. Атанас, нос Русалка и нос Царево в Черно море.

2. Химикали

2.1. Технически натриев алгинат за хранителни цели (Grindsted Alginate FD 120) − доставен от фирмата P.I.C.Co. Разтворим във вода и пепелно съдържание 18 - 27%.
2.2. Химически чист калциев дилактат
2.3. Химически чист етанол – 70% и 96%
2.4. Безводен метанол
2.5. Химически чист янтарен анхидрид
2.6. Химически чиста солна киселина
2.7. Химически чист 25% амоняк
2.8. Химически чист натриев цитрат
2.9. Химически чист калциев дихлорид

3. Методи за анализ

3.1. Пепелно съдържание − БДС 7646-82
3.2. Сухо вещество − БДС EN 12145-2000
3.3. Съдържание на захари − БДС 7169-89
3.4. Съдържание на мазнини − БДС 6997- 84
3.5. Общ белтък − БДС 14431-78 (по метод на Келдал с апарат на Парнас-Вагнер).
3.6. Водна активност (a_w) − BS ISO 21807:2004
3.7. Определяне на общи полифеноли
3.7.1. Подготовка на пробата − към 2 g размръзена суровина се прибавят 50 ml дестилирана вода в 100 ml колба и се добавя 40 ml етанол. След 12 часа престой колбата се долива до марката с етанол, филтрува се и филтратът се анализира.

3.7.2. Определяне съдържанието на общи полифеноли − в кювета от 1 cm се дозират последователно 0,2 ml от филтрата, 0,5 ml реактив на

Folin-Chocalteau (разреден обемно с дестилирана вода в съотношение 1:10) и 0,8 ml 7,5 % динатриев карбонат. Аналогично се приготвя празна (нулева) проба с дестилирана вода вместо филтрат. След престой в продължение на 30 min на тъмно и при стайна температура се определя абсорбцията при 765 nm на реакционната смес. Получените резултати се представят като еквиваленти на галовата киселина GAE mg/l, отчетени спрямо стандартна права.

3.8. Определяне елементния състав на морските кафяви водорасли (*Cystoseira barbata*)

Елементният състав е определен чрез валидиран в ИИРХ - Пловдив метод − мултиелементен анализ чрез ICP-AES спектрометър SPECTROFLAME MODULA - FTMOA81A.

3.9. Модифицирана високотемпературна алкална екстракция

3.9.1. **Подготовка на суровината (кафяви водорасли)**

Суровината се запазва чрез замразяване. Водораслите се измиват и нарязват на ивици с дължина 1 cm и се съхраняват в хладилен шкаф при температура – 18ºC.

3.9.2. **Подкисляване на кафявите морски водорасли *Cystoseira barbata***

След размразяване към 10 g водорасли се прибавят 50 ml 0,5 N солна киселина и получената киселинна смес престоява едно денонощие при стайна температура и периодично разбъркване. Целта на подкисляването е да се инактивират ензимите във водораслите и да се премахнат калциевите йони. След това сместа се филтрува през капроново платно, водораслите се промиват с дестилирана вода за отделяне на солно-киселия етанол и се коригират до неутрално pH - 7.

3.9.3. **Подкисляване на кафявите морски водорасли по метода на Мак Креди** (McCredy and McComb, 1952)

Към дефростираните водорасли се прибавя 100 ml 70% етанол, който съдържа 5 ml концентрирана солна киселина. Сместа се разбърква с механична бъркалка в продължение на 1 час. Филтрува се през бюхнерова фуния и се промива неколкократно със 70% етанол до неутрално pH и

след това двукратно с 96% етанол, за да се дехидратира пробата. Промитите водорасли се сушат при 40ºС до постоянно тегло.

3.9.4. **Алкализиране на кафявите морски водорасли**

Към промитите и неутрализирани водорасли се прибавят 200 ml 4% Na_2CO_3 за коригиране на pH - 13, сместа се разбърква бавно в продължение на 12 часа при температура 80^oC. Реакционната смес се филтрува през капроново платно и се промива с дестилирана вода за по-пълно отделяне на получения натриев алгинат.

3.9.5. **Обработка с активен въглен**

Към 500 ml от разтвора на натриевия алгинат се добавя 1 g активен въглен. Разтворът се хомогенизира и се оставя да престои 30 - 40 min при стайна температура. Филтрува се през филтърна хартия, за отделяне на активния въглен.

3.9.6. **Преципитация на получения натриев алгинат**

Към 200 ml разтвор от получения натриев алгинат се прибавят 165 ml 1N солна киселина (HCl) за подкиселяване на средата до pH - 1,9 и преципитация на алгиновата киселина.

3.9.7. **Утаяване и филтриране на алгиновата киселина**

При взаимодействие на сярната киселина с натриевия алгинат се получава утайка от алгинова киселина и течна фаза от Na_2SO_4, CO_2 и вода. Така получените съединения престояват в реакционната смес за 12 часа при периодично разбъркване, като в последните 2 - 3 часа сместа се оставя в покой за отделяне на утайката от алгинова киселина. След това реакционната смес се филтрува през капроново платно.

3.9.8. **Дехидратиране на получената алгинова киселина**

Получената алгинова киселина се подлага на вакуумфилтрация през шихтов филтър и се промива еднократно с 50% етанол за 20 - 30 min, двукратно със 75% етанол и двукратно с 95% етанол. Получената алгинова киселина се изсушава във вакуум сушилня за 12 часа при 40^oC до постоянна маса за определяне на добива. Добивът (рандеманът) на получената алгинова киселина се определя тегловно.

3.9.9. **Обезцветяване на получената алгинова киселина**

Към 1 g от получената алгинова киселина се прибавя 10 ml 30% перхидрол при престой от 48 часа и периодично разбъркване. Филтрува се под вакуум и се суши за 24 часа при 40°C.

3.10. Химична модификация на алгинова киселина

3.10.1. **Получаване на алгинова киселина от натриев алгинат**

На аналитична везна се притеглят 5 g натриев алгинат (Grindsted Alginate FD 120), който се прехвърля количествено в колба от 500 ml с 420 ml дестилирана вода. Получената смес се разбърква и се разтваря на кипяща водна баня до получаването на хомогенен 1% разтвор на натриев алгинат. Разтворът се охлажда за 15 min и се допълва до марката на колбата. Целият разтвор на натриев алгинат се прехвърля в ерленмайерова колба от 1 L, подкислява се с 250 ml 0,1N HCl до pH - 2,3 при което натриевият алгинат преципитира и се получава алгинова киселина и натриев хлорид. Сместа се центрофугира при 4500 min^{-1} за 10 min. Течната фаза (NaCl) се отделя чрез промиване с 70% етанол, а твърдата фаза (алгинова киселина) се смива от центрофужната епруветка двукратно с 20 - 30 ml 70% етанол и с 96% етанол. След това алгиновата киселина се филтрува през стъклен филтър (шотов филтър) и се подлага на вакуум сушене при 48 - 50°C при вакуум – 1 atm за време 20 часа. Тегловно на аналитична везна се определя добивът на получената алгинова киселина.

3.10.2. **Метилиране на алгинова киселина**

10 g алгинова киселина се суши предварително за 12 часа при 40ºC, за да се дехидратира. Така изсушена, алгиновата киселина се метилира с 2M H_2SO_4/CH_3OH, модул 1:10 за 25 часа при 40ºC и периодично разбъркване. След това се промива трикратно със 70% етанол до неутрална реакция и двукратно с 95% етанол. След изсушаване в камерна сушилня се анализира. Изходната алгинова киселина се анализира като полигалактуронова киселина. Метилираната алгинова киселина се анализира като пектин.

3.10.3. **Амидиране на метилирана алгинова киселина**

10 g метилирана алгинова киселина се заливат със 100 ml охладена смес от 70 ml 70% етанол и 30 ml 25% амоняк. Сместа се оставя в хладилник за 3 часа (при +4ºC) при периодично разбъркване. Филтрува се под вакуум чрез бюхнерова фуния и остатъкът върху фунията се прехвърля

в колба, където се залива с 30 ml солнокисел етанол (в 1 L 70% етанол се прибавят 50 ml к. HCl – 36 - 37%) за 30 min. След това се промива двукратно със 70% етанол и еднократно с 96% етанол. Получената амидирана алгинова киселина се суши при 40ºC за 12 часа.

3.10.4. **Получаване на сукцинирана алгинова киселина**
(модифициран метод (Sathe and Salunkhe, 1981;Trubiano, 1986)

На аналитична везна се претеглят 5 g натриев алгинат и 0,5 g янтърен анхидрид. Измерените количества се смесват и разбъркват, като се получава механична смес. Към получената механична смес се прибавя 10 ml 0,01M натриева основа за получаване на смес с pH - 9. Сместа се оставя за 4 часа при стайна температура и периодично се разбърква. Прибавят се 30 - 40 ml солно-кисел етанол за прекъсване на реакцията и получаване на среда с pH 6. Филтрува се сукцинираната алгинова киселина.Полученият алгинилсукцинат се залива еднократно с 30 - 40 ml 50% етанол за 30 min, двукратно с 30 - 40 ml 70% етанол за 30 min, еднократно с 30 - 40 ml 96% етанол за 18 часа и накрая с 30 - 40 ml безводен метанол. Филтрува се под вакуум. Получената сукцинирана алгинова киселина се суши за 18 часа във вакуум сушилня при температура 30ºC − 40ºC.

3.11. Определяне на характеристичен вискозитет и средна молекулна маса на алгинати

За пресмятане на молекулната маса на алгиновите деривати и натриев алгинат чрез характеристичния вискозитет е необходимо да се знае неговото относително нарастване в разтвора в зависимост от концентрацията на разтворения полимер. То се намира от съотношението на времето на изтичане на чистия разтворител (дестилирана вода) − t_0 = 15,2 s и на разтвора − t:

$$\eta_{сп} \sim t/t_0 - 1 = \eta_{отн} - 1$$

Влиянието на концентрацията върху вискозитета на разтвора се изчислява посредством екстраполация на редуцирания вискозитет $\eta_{сп} / C$ или логаритмичния вискозитет $\ln\eta_{сп} / C$ към безкрайно разреждане. Получената величина се нарича граничен вискозитет или гранично вискозитетно число и се бележи с [η]. Нейната размерност е cm^3/g или dl/g в зависимост от това в какви единици е изразена концентрацията на изследвания разтвор. Характеристичният вискозитет е определен чрез стъклен Ubbelohde вискозиметър (VWR International France, Fontenay-sous-

Bois, France), като изследваните проби се разтварят предварително с 1N натриева основа и цитратен буфер при pH - 7,5. Вискозиметърът се поставя във водна баня с температура 25°C ± 0,1°C. Граничният вискозитет се определя практически като се измери вискозитета на чистия разтворител и изследваната проба. За целта във вискозиметъра се слагат 10 ml от изследваната проба (натриев алгинат и алгинови деривати), която се разрежда с 5 ml дестилирана вода при 5 различни концентрации. След това графично се изразява зависимостта $\eta_{сп} / C = f(C)$ и получената права се екстраполира към C = 0. Отрязъкът от ординатата е равен на [η], а наклонът на правата линия представлява коефициента $k'[\eta]^2$, който характеризира разтворимостта на полимера в разтворителя *k′*.

$$\eta_{ред} = [\eta] + k'[\eta]^2.C$$

Характеристичният вискозитет [η] се измерва чрез капилярен вискозиметър (фиг. 10) и се изчислява с уравнението на Huggins.

$$\eta_{сп}/C = [\eta] + k_h.[\eta]^2.C$$

където:

$$\eta_{сп} = (t_s - t_0)/t_0$$

където:

$\eta_{сп}$ − специфичен вискозитет

η − характеристичен вискозитет, ml/g

k_h – константа на Хъгинс (0,3 - 0,5)

t_0 – време на изтичане на разтворителя, s

t_s – време на изтичане на алгиновите деривати (пробата), s

C – процентна концентрация на измерваната проба

Средната молекулна маса на алгинатите се определя с уравнението на **Mark-Houwink-Sakurada** (Shao et al., 2011), а именно:

$$[\eta] = 0{,}023 . Mw^{0{,}984}$$

където:

η − храктеристичен вискозитет, dl/g

Mw − средна молекулма маса, kDa

3.12. Термофизична характеристика на алгинати и алгинови деривати

От изследваната проба (алгинат и алгинови деривати) се взема 15 mg и се поставят в корундовия тигел на апарата Seratam-141 DTA-TG, Франция, който е с разделителна способност 0,02 μg Пространството около тигела е изпълнено с газов носител − синтетичен въздух, който се подава към пробата със скорост 20 ml/min. Пробата се загрява със скорост 5^{o}C/min до температура 300^{o}C. Чрез апарата се регистрират положителни или отрицателни температурни разлики, като по този начин се съди за протичането на някои екзо- или ендотермични процеси.

3.13. Инфрачервена спектроскопия на алгинати и алгинови деривати

Взема се по 0,004 g от алгинатите или алгиновите деривати и 0,2 g калиев бромид, които се изсушават в ексикатор за 24 - 36 часа и се накалява за период от 3 - 5 часа при температура 110^{o}C. Получените и обработени предварително химични вещества (алгинати, алгинови деривати и калиев бромид) се стриват в ахатово хаванче. На преса се оформя контролна таблетка от 0,2 g чист калиев бромид, с която се калибрира инфрачервения спектрофотометър (IR-FT „Avatar Nicolet" TermoScience). Накрая се поставя работната таблетка (пробата за анализ) в апарата и се заснемат инфрачервените спектри.

3.14. Определяне сила на разкъсване и деформация на алгинатни желета

Реологичните изследвания на алгинатните желета за силата на разкъсване и деформация са проведени с текстурен анализатор Stable Microsystems Texture Analyzer (SMS) в режим на едноосна деформация при разкъсващо напрежение от 85%, при постоянна скорост на деформация от 0,5 mm/s, чрез алуминиево цилиндрично бутало с диаметър 25 mm, при температура 25^{o}C. Измерени са по 18 образци с цел по-добра статистика и при пълен фактор на експеримента.

3.15. Сензорен анализ

В сензорната лаборатория на ИИРХ се проведе консуматорски сензорен тест за възприемане на нискокалорични желирани продукти от къпини и круши. Оценителите в теста (n=10) оценяват по 9-точкова хедонична скала (1-изключително не харесвам и 9-изключително харесвам) две проби от изследвания продукт по следните сензорни показатели: външен вид, цвят, вкус и мирис, консистенция (твърдост) и интензитет на сладост, киселинност, сочност и послевкус. Оценките се попълват в дегустационна карта, а продуктите се поднасят на консуматора в балансирана последователност. Данните от сензорните оценки са представени графично като са използвани осреднени стойности за всеки от сензорните атрибути.

3.16. Микробиологични изследвания на алгинати и алгинови деривати

Проведен е микробиологичен анализ за установяване възможността на различни патогени (*Entherococcus faecalis, Salmonella spp),* условно патогени микроорганизми (*Candida tropicalis, Aspergillus niger, Helicobacter pylori),* плесени и дрожди да се развиват в изследваните алгинати и алгинови деривати. При анализите е следвана методологията съгласно: **БДС ISO 21527-2/2011 -** за плесени и дрожди, **БДС EN ISO 7932/2005 -** за *Bacillus cereus,* **БДС EN ISO 6888-1/2000** - за *Staphylococcus aureus,* **БДС EN ISO 7899-2/2000 -** за чревни ентерококи, **ISO 16649-2/2001** - за *Escherichia coli,* **БДС EN 26461/2004** - за сулфид редуциращи клостридии, **БДС EN ISO 6579/2003 -** за *Salmonella*

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Направена е физикохимична характеристика и сравнителен количествен анализ на някои органични химични съединения и минерален състав на пресни кафяви водорасли от три района в Черно море, край град Варна. Получените резултати са представени в таблица 1.

1. Физична и химична характеристика на кафяви морски водорасли *Cystoseira barbara* от различни райони в Черно море

Таблица 1. Физикохимичен състав на кафяви водорасли Cystoseira barbata от различни Черноморски райони

Водорасли	*Cystoseira barbata*	*Cystoseira barbata*	*Cystoseira barbata*
Черноморски район	Св. Атанас	Русалка	Царево
Алгинова киселина - % / сухо вещество	19,6	18,3	19,0
Сухо вещество - %	25,40	27,27	26,29
Пепелно съдържание - %	16,28	4,59	2,69
Общ белтък - %	2,47	1,26	2,04
Общи мазнини - %	1,03	0,64	0,89
Общи захари - %	0,65	0,96	0,23
Общи поли феноли -mg% GAE	168	164	669
Магнезий - Mg - mg/kg	1669,67	1782,21	1803,26
Фосфор- P - mg/kg	95,63	106,88	79,28
Арсен- As- mg/kg	3,85	3,92	4,08
Кадмий- Cd - mg/kg	0,15	0,20	0,19
Олово- Pb - mg/kg	1,10	1,47	0,56

От данните се вижда, че съдържанието на алгинова киселина е най-високо при кафявите водорасли от нос св. Атанас, а най-малко от район Русалка. По отношение на сухо вещество най-високи стойности на показателите имат водораслите от район Русалка. Най-ниско сухо вещество имат водораслите от район св. Атанас, а пепелно съдържание − от район Царево. Съдържанието на пепел от района св. Атанас е шест пъти по-високо в сравнение с това на район Царево. Подобни различия по райони се отчитат и при останалите показатели − общ белтък, захари,

мазнини и полифеноли. Съдържанието на общ белтък в морските водорасли от район св. Атанас е двойно по-голямо в сравнение с това от район Русалка. Съдържанието на общи захари от район Русалка е четири пъти по-високо от това на водораслите от район Царево. Водораслите от район св. Атанас съдържат 1,6 пъти повече мазнини в сравнение с водораслите от район Русалка. По отношение съдържанието на полифеноли водораслите от район Царево има четири пъти по-високи стойности в сравнение с тези от районите св. Атанас и Русалка.

Различия по райони има и по отношение съдържанието на елементния състав. Най-високо съдържание на магнезий имат водораслите от район Царево, а най-ниско − от район св. Атанас. По отношение съдържанието на елемента фосфор във водораслите от район Русалка има 1,3 пъти по-голямо количество в сравнение с район Царево.

Изследвано е и съдържанието на тежки метали във водораслите в различните райони. Данните показват най-високо съдържание на арсен в района на Царево, за кадмий − в района на Русалка и Царево и за олово − в района на Русалка. Вероятно тези различия се дължат на различната замърсеност на водите в тези райони. Нашите изследвания потвърждават проучванията и на други автори за различни видове кафяви водорасли (Connan et al., 2004*;* Khan et al., 2007*;* Li and Kornfeld, 1979; Marinho-Soriano et al., 2006*;* Murata and Nakazoe, 2001).

2. Методи за екстракция на алгинова киселина

2.1. Метод за високотемпературна алкална екстракция на алгинова киселина от кафяви морски водорасли *Cystoseira barbata*

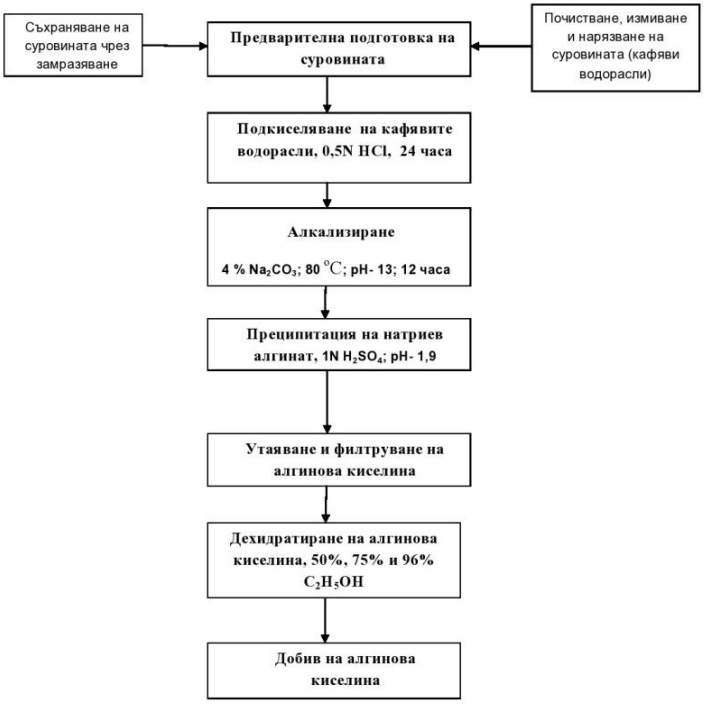
За екстракция на алгинова киселина от кафяви морски водорасли от вида *Cystoseira barbata* е използван метода за високотемпературна алкална екстракция, използван и от други учени (Haug, 1974; Hernandez-Carmona et al., 1999; Hernández-Carmona et al., 2002; McHugh et al., 2001; Perez, 1992), които са направили най-задълбочени проучвания върху добива на алгинати от кафяви водорасли *Macrocystis pyrifera*, работейки по всички етапи на директния и индиректния метод за получаване на алгинати.

Екпериментални изследвания са проведени с кафяви черноморски водорасли *Cystoseira barbata* (от района на св. Атанас). Основание за този избор е най-високото съдържание на алгинова киселина и ниското съдържание на полифеноли (табл. 1) във водораслите от този район.

Ниското съдържание на полифеноли (Moen et al., 1997a,b) е предпоставка за намаляване на действието на ендогенните алгинат лиази, които катализират действието на естествените полифеноли в кафявите водорасли и предизвикват разпадане на алгинатите и алгиновата киселина.

На фиг. 1-а е представена блок схема за получаване на алгинова киселина от кафяви водорасли в съответствие с методите, използувани от цитираните автори.

Принципно методът на екстракция на алгинова киселина включва последователно следните етапи на обработка на водораслите − предварителна подготовка на суровината (почистване, измиване, нарязване и съхранение), подкисляване, алкализиране, преципитация, утаяване, филтруване, дехидратация, определяне добива на алгинова киселина.

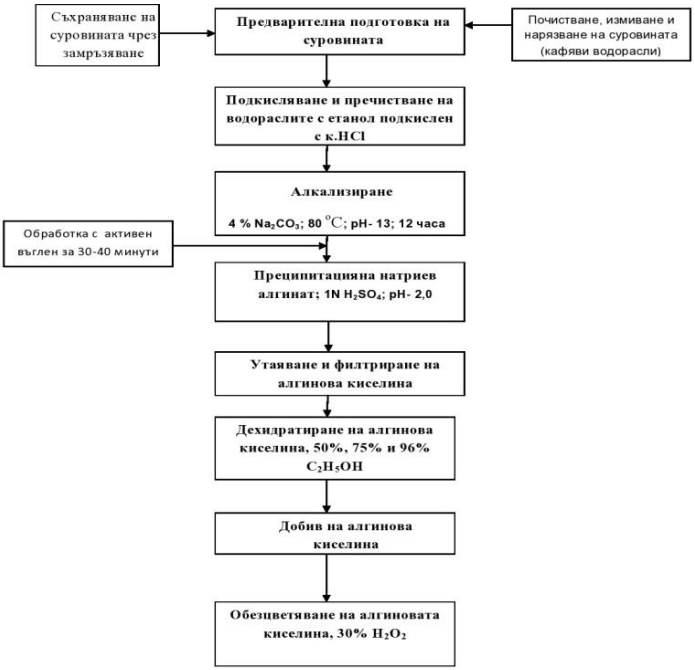


Фигура 1 а. Блок схема на екстракция на алгинова киселина от кафяви водорасли *Cystoseira barbata*

2.2. Модифициран метод на високотемпературна алкална екстракция от кафяви морски водорасли

На фиг. 1-б е представена блок схема на високотемпературна алкална екстракция от кафяви морски водорасли *Cystoseira barbata* по модифициран от нас метод. Принципно методът на екстракция на алгинова

киселина включва последователно етапите на обработка на водораслите, описани в т. 2.1 с няколко промени: предварителна подготовка на суровината (почистване, измиване, нарязване и съхранение), **подкисляване и пречистване**, алкализиране, **обработка с активен въглен**, преципитация, утаяване, филтруване, дехидратация, **обезцветяване**, определяне добива на алгинова киселина. Модификацията се изразява в три допълнителни етапа на обработка на водораслите, както е видно и от блок схемата 1-б



Фигура 1 б. Блок схема на модифициран метод на екстракция на алгинова киселина от кафяви водорасли *Cystoseira barbata*

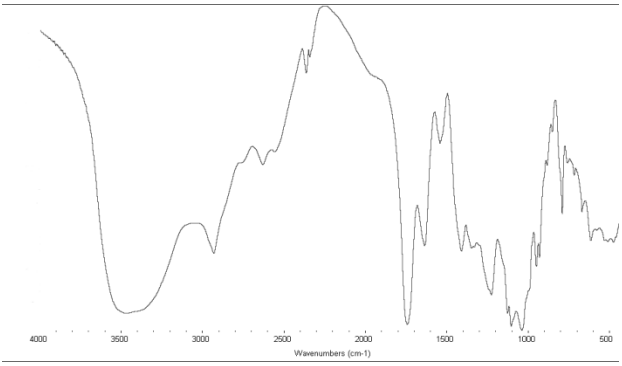
В таблица 2 са представени резултатите за добив на алгинова киселина от кафяви морски водорасли *Cystoseira barbata*, разработени по двата метода.

Таблица 2. Физикохимичен състав на кафяви водорасли Cystoseira barbata при различни методи на екстракция

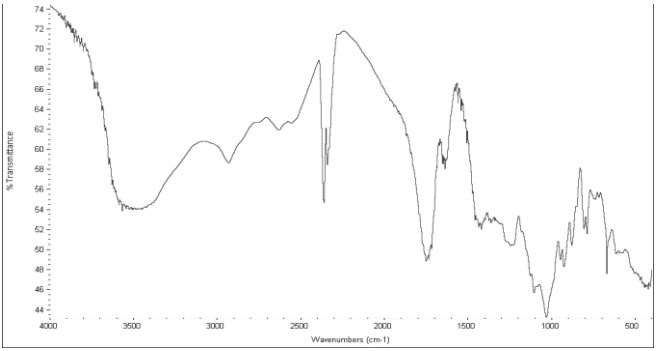
Метод на екстракция на водораслите	Сухо вещество %	Добив на алгинова киселина / сухо вещество, %	Пепелно съдържание, %
Високотемпературна алкална екстракция	25,40	19,60	16,28
Модифициран метод на високотемпературна алкална екстракция	25,40	72,10	7,35

В резултат на допълните обработки на водораслите по модифицирания метод на екстракция, показан на фиг. 1-б, се установи, че добива на алгиновата киселина се увеличава 3,6 пъти. Успоредно с това е определено полиуронидното съдържание на получената алгинова киселина и съотношението на мануронова киселина / гулуронова киселина. Съдържанието на уроновите киселини е 89,24%, което показва висока чистота на получената алгинова киселина. Съотношението мануронова киселина / гулуронова киселина (M/G) е 1,04, което е близко по стойност до това на алгиновата киселина, екстрахирана от дръжките на кафявите водорасли *Macrocystis pyrifera* (Ji et al., 1984). За доказване на автентичността на екстрахираната алгинова киселина от кафяви черноморски водорасли *Cystoseira barbata* са сравнени инфрачервените спектри на екстрахираната алгинова киселина и алгинова киселина, получена от натриев алгинат.

На фиг. 2-а и 2-б са показани инфрачервените спектри на получената алгинова киселина от натриев алгинат и спектърът на получената алгинова киселина по модифицирания метод на високотемпературната алкална екстракция от кафявите морски водорасли. Целта е да се сравнят двете химични съединения и се докаже тяхната идентичност по отношение химичната им структура.



Фигура 2 а. Инфрачервен спектър на алгинова киселина, получена от натриев алгинат



Фигура 2 б. Инфрачервен спектър на алгинова киселина, екстрахирана по модифицирания метод

От фигурите се вижда, че в областта с деформационна характеристична честота от 1395 - 1440 cm^{-1} се намира ивица с нисък интензитет на поглъщане на C-O-H - връзките, а в областите с характеристична честота на поглъщане 910 – 950 cm^{-1} и 2500 - 3000 cm^{-1} се забелязват ивиците на поглъщане на OH - групите при двата вида алгинови киселини. От 1210 до 1320 cm^{-1} се вижда ивица със среден интензитет на поглъщане от C-O - връзката при двете изследвани химични съединения. При характеристична честота на поглъщане 1710 - 1780 cm^{-1} се наблюдава много ясно изразена спектрална ивица на поглъщане от карбонилната група (C=O) при екстрахираната (фиг. 2-б) и получената от натриев алгинат алгиновата киселина (фиг. 2-а).

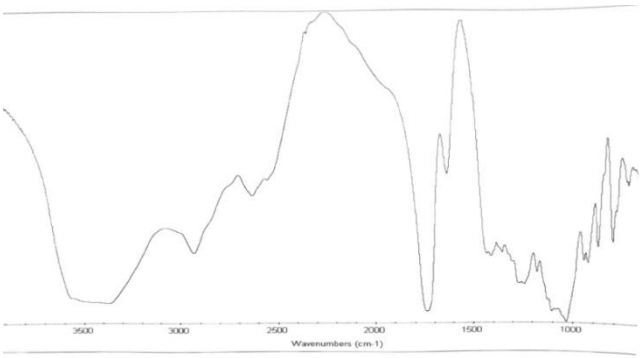
Чрез заснетите инфрачервени спектри и доказаните чрез тях химични връзки и групи се установи, че двете изследвани химични вещества са едни и същи, т.е. химически са идентични.

3. Химична модификация на алгинова киселина - получаване на метилалгинат, алгинамид и алгинилсукцинат

3.1. Химичен синтез на алгинови деривати - получаване на метилалгинат, алгинамид и алгинилсукцинат

В резултата на проведените химични експерименти от алгинова киселина, получена от натриев алгинат, са синтезирани различни по химична природа алгинови деривати. Тяхната химична структура е доказана чрез заснемане на инфрачервени спектри на химични алгинови деривати, получени чрез модифициране на карбоксилните и хидроксилните групи на алгиновата киселина.

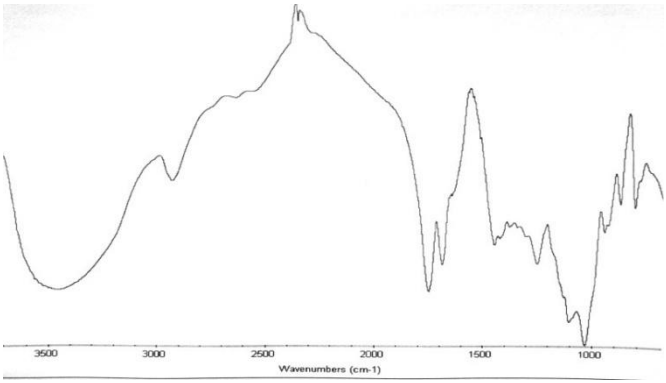
Модифицирането на алгинова киселина до метилалгинат се получава при взаимодействие на алгинова киселина с метилов алкохол. На фиг. 3 е показан инфрачервеният спектър на синтезирания метилалгинат, който се получава чрез заместване на ОН-групата от карбоксилната група на алгиновата киселина с метиленова група. В резултат на тази химична модификация се наблюдава една допълнителна ивица на поглъщане от страна на CH_3-групата в спектъра.



Фигура 3. Инфрачервен спектър на метилалгинат

Деформационните трептения на CH_3 - групите при метиловия естер на алгиновата киселина се появяват в инфрачервения спектър в областта 1370 - 1390 cm^{-1} и при валентна характеристична честота на поглъщане 2950 - 2970 cm^{-1} (фиг. 3).

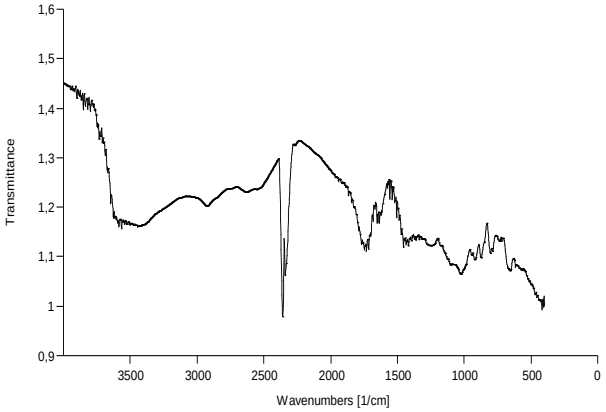
Модифицирането на алгинова киселина до алгинамид се получава при взаимодействие на алгинова киселина с амоняк. На фиг.4 е показан инфрачервения спектър на синтезирания алгинамид, който се получава чрез заместване на OH - групата от карбоксилната група на алгиновата киселина с NH_2 - група. В резултат на тази химична модификация се наблюдава една допълнителна ивица на поглъщане от страна на амидната група в спектъра.



Фигура 4. Инфрачервен спектър на алгинамид

В инфрачервения спектър на алгинамида при характеристична честота на поглъщане от 1550 - 1640 cm^{-1} и от 3030 - 3130 cm^{-1} се забелязват две ивици с нисък и висок интензитет, характерни за N-H връзките в молекулата. При характеристична честота на поглъщане от 1230 - 1310 cm^{-1} и от 1630 - 1690 cm^{-1} (фиг.4) се забелязват характерни спектрални ивици за C-N - връзките и за C=O - групите в молекулата на алгинамида.

Модифицирането на алгинова киселина до алгинилсукцинат се получава при взаимодействие на алгинова киселина с янтърен анхидрид. Синтезираният алгинилсукцинат се получава чрез свързването на една от карбоксилните групи на янтърния анхидрид с хидроксилната група от молекулата на алгиновата киселина. В резултат на тази химична модификация се наблюдава по-голяма абсорбция от страна на метиленовите и карбоксилни групи в молекулата на алгинилсукцината.



Фигура 5. Инфрачервен спектър на алгинилсукцинат

При характеристична деформационна честота на трептене от 1450 - 1480 cm^{-1} и валентна честота от 2915 - 2930cm^{-1} се виждат две характерни ивици на поглъщане на CH_2 - групите в молекулата на алгинилсукцината. При честота от 1710 - 1780 cm^{-1} се забелязва характерна ивица на поглъщане от C=O групата в инфрачервеният спектър на алгинилсукцината.

3.2. Физикохимична и реологична характеристика на алгинати и алгинови деривати

В таблица 10 са дадени някои физикохимични характеристики на алгинова киселина, натриев алгинат и алгинови деривати – метилалгинат, получен чрез метилиране на алгинова киселина; алгинамид - чрез амоняк и алгинилсукцинат - чрез янтърен анхидрид.

Таблица 3. Физикохимична и реологична характеристика на алгинати и алгинови деривати

Наименование	Натриев алгинат	Метилалгинат	Алгинамид	Алгинилсукцинат
Водна активност, a_w	0,222	0,245	0,286	0,278
Характеристичен вискозитет, dL/g	4,12	4,01	2,22	5,56
Молекулна маса, kDa	194,8	186,9	103,9	264,3
Степен на статично набъбване	3,3:1	4:1	2,4:1	2,6:1
Степен на естерификация / амидиране, %	-	54,3	10,09/49,98	10,4
Полиуронидно съдържание, %	-	80,40	49,71	-

В резултат на проведените експерименти се установи, че най-малка молекулна маса има алгинамида, а най-голяма − алгинилсукцината. Получените резултати в таблица 10 показват, че най-малък характеристичен вискозитет има алгинамида, а най-голям − алгинилсукцината. Стойностите за водна активност на натриев алгинат, метилалгинат, алгинамид и алгинилсукцинат са близки. Най-висока степен на статично набъбване има метилалгината − 4:1.

3.3. Пенообразуваща способност на алгинова киселина и алгинови деривати

Таблица 4. Пенообразуваща способност на алгинати и алгинови деривати

Химично съединение	Концентрация %	Стабилност на пяна %	Плътност на пяна g/cm^3
Натриев алгинат	1,20	50,00	0,30
	1,00	60,00	0,20
	0,80	50,00	0,20
	0,60	50,00	0,15
	0,40	25,00	0,10
Алгинова киселина	1,20	50,00	0,20
	1,00	33,30	0,16
	0,80	16,60	0,13
	0,60	25,00	0,15
	0,40	50,00	0,10
Метилалгинат	1,20	57,10	0,17
	1,00	75,00	0,12
	0,80	50,00	0,13
	0,60	60,00	0,12
	0,40	75,00	0,10
Алгинамид	1,20	50,00	0,60
	1,00	50,00	0,50
	0,80	66,60	0,26
	0,60	66,60	0,20
	0,40	50,00	0,20
Алгинилсукцинат	1,20	66,60	0,40
	1,00	60,00	0,20
	0,80	62,50	0,20
	0,60	70,00	0,12
	0,40	66,00	0,13

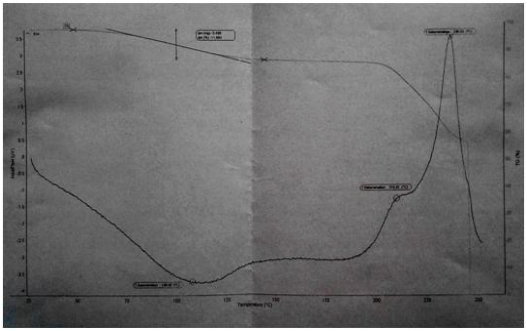
В резултат на проведените експерименти и получените данни се установи, че при 0,40% и 1% метилалгинат стабилността на пяната е най-голяма − 75,00%, а най-ниска − 16,60% е при 0,8% алгинова киселина. По отношение на показателя плътност на пяната - 0,60 g/cm^3 има при 1,20% алгинамид, а най-ниска − 0,10 g/cm^3 при 0,4% натриев алгинат, алгинова киселина и метилалгинат. От представените данни се вижда, че при една и съща концентрация - 0,40% и плътност на пяната - 0,10 g/cm^3 на натриев алгинат, алгиновата киселина и метилалгинат, стабилност на пяната на тези химични съединения в тази последователност се увеличават с по 50%. Наблюдава се също, че при една и съща концентрация - 0,8% и плътност на пяната - 0,13 g/cm^3 на алгиновата киселина и метилалгинат, стабилността на пяната при метилалгината е 3 пъти по-голяма в сравнение с тази на алгиновата киселина.

4. Термофизична характеристика на алгинати и алгинови деривати чрез диференциален термичен и термогравиметричен анализ

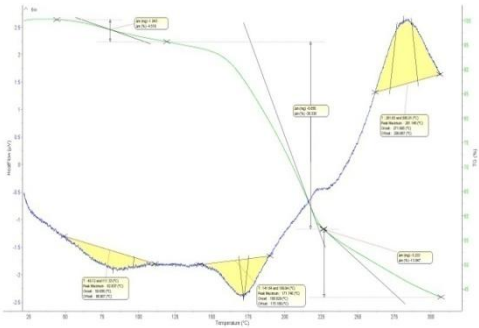
Физикохимичната термостабилност на получените алгинати и алгинови деривати е определена чрез диференциално термичен и термогравиметричен анализ (DTA - TG) със съответните термограми (фиг. 6, 7, 8, 9 и 10).

В резултат на проведените експерименти и получените стойности от диференциално термичните криви се виждат различните температурни максимуми на екзо- и еднотермичните фазови преходи. Фазовите преходи, показани на всички термограмите са свързани с два основни ендотермични и един екзотермичен процес. Върху диференциално термичната крива на алгинатите и алгиновите деривати са изобразени следните процеси: загуба на абсорбционно свързана вода, карамелизация свързана със структурни промени и отделяне на вода и пиролиза (деполимеризация на полизахаридната верига). Площта на всеки един от пиковете, показани на диференциално термичните криви представлява енталпията на дадения термичен фазов процес. От представените резултати се вижда, че най-много вода се изпарява при температура от 60,5^{o}C до 121,2^{o}C при алгинилсукцината (фиг. 10), а най-малко при метилалгината (фиг. 8) в температурния интервал от 73,2^{o}C до 96,0^{o}C. Останалите химични вещества (натриев алгинат, алгинова киселина и алгинамид) изпаряват абсорбционно свързаната си вода в температурните граници от 50^{o}C до 112^{o}C (фиг. 6, 7 и 9). Установи се също, че най-голямо количество топлина се отделя при пиролизата на алгинилсукцината (фиг. 10) в температурен интервал от 237,1^{o}C до 296,6^{o}C, а най-малко при деполимеризацията на алгинамида (фиг. 9) в температурен интервал от 231,3^{o}C до 232,0^{o}C. Тези големи различия в стойности на енталпиите на алгинилсукцината и алгинамида се обясняват с разликата в степените на сукциниране

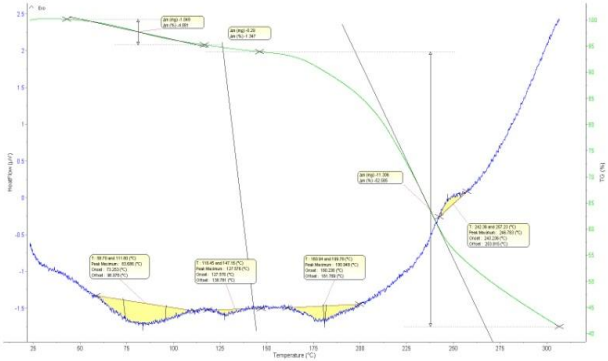
(естерификация) и амидиране и съответно на свободните COOH - групи. При пиролизата на алгинилсукцината се отделя много по-голямо количество енергия спрямо алгинамида, тъй като количеството на свободните карбоксилни групи е много по-голямо в сравнение с това на алгинамида. В резултат на химичната модификация колкото повече останали свободни карбоксилни групи има, толкова повече топлинна енергия се отделя при декарбоксилирането на тези групи в резултат на пиролизата. От фиг. 8 и 9 се вижда, че енталпията при деполимеризация на метилалгината е много близка по стойност до тази на алгинамида, което се обяснява с факта, че имат почти еднакво количество естерифицирани и респективно свободни карбоксилни, чийто групи при пиролиза декарбоксилират и се отделя почти еднакво количество топлина. С получените термограми са показани измененията в стойностите на енталпиите на модифицираните химични съединения на алгинова киселина при някои основни термични фазови процеси (преходи) в дадени температурни интервали.



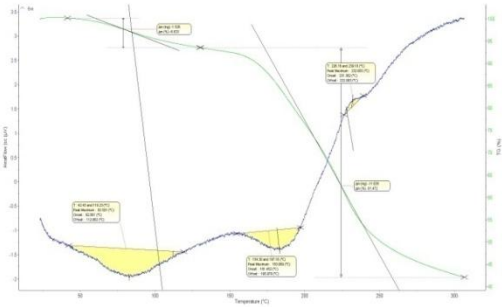
Фигура 6. Термограма на натриев алгинат



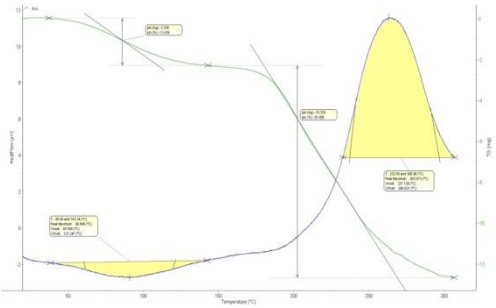
Фигура 7. Термограма на алгинова киселина



Фигура 8. Термограма на метилалгинат



Фигура 9. Термограма на алгиниламид



Фигура 10. Термограма на алгинилсукцинат

От термогравиметричните криви на алгиновите деривати, получени чрез термогравиметричен и диференциално термичен анализ се установи, че с увеличаване на температурата най-голяма загуба на маса в резултат на изпаряване на вода или други летливи компоненти има алгинилсукцината (фиг. 10), където загубата на маса е 55,49%, а най-малка (фиг. 6) при натриевия алгинат − 11,66%. Загубата на масата на алгиновата киселина, метилалгината и алгинил амида, са съответно 38,33%, 52,58% и 51,47% (фиг. 7, 8 и 9).

5. Микробиологични изследвания на алгинати и алгинови деривати

Проведени са експерименти за определяне на инхибиращата активност на алгинати и алгинови деривати върху някои щамове микроорганизми. В хранителните среди конвенционалният енергиен източник (таблица 5) е заменен от натриев алгинат, метилалгинат, алгинамид и алгинилсукцинат при концентрация 0,2%. За настоящото изпитване са подбрани щамове, имащи отношение към хигиената (индикаторни микроорганизми) и безопасността на хранителните продукти (патогенни / условно патогенни микроорганизми). Проведен е микробиологичен анализ за установяване възможността на различни патогени (*Entherococcus faecalis, Salmonella spp)* и условно патогенни микроорганизми (*Candida tropicalis, Aspergillus niger, Helicobacter pylori* и *Bacillus cereus*) да се развиват в изпитваните алгинови деривати. След проведения анализ се установи, че плесените и дрождите се развиват в присъствието на всички полизахариди. Метилалгинатът проявява антимикробна активност, спрямо четирите бактериални щама (*Helicobacter pylori, Bacillus cereus, Entherococcus faecalis, Salmonella sp*.). При метилалгината не се отчита инхибиращо действие върху развитието на плесени и дрожди (табл. 5). Развитието на *Bacillus cereus, Entherococcus*

faecalis се подтиска в присъствието на алгиниламид също при концентрация 0,2% (табл. 5).

При същата концентрация се установи, че всички изследвани щамове се развиват в присъствието на натриевия алгинат и алгинилсукцинат, което показва, че дадените микроорганизми могат да използват тези химични вещества като енергиен източник. От представените в таблица 5 резултати се вижда, че алгинамидът и метилалгинатът проявяват антимикробна активност към Грам-положителния микроорганизъм *Bacillus cereus*. Подобни резултати за антимикробен ефект към тези бактерии са докладвани и за други модифицирани въглехидрати, като сукроестери и инулинови естери (Петкова, 2014; Kabara and Marshall, 2005). Освен, това трябва да се отбележи и способността на тези алгинови деривати да инхибират растежа на Грам-отрицателните бактерии *Helicobacter pylori NBIMCC 3731* и *Salmonella spp NBIMCC 1423.*

Таблица 5. Развитие на различни индикаторни щамове микроорганизми в присъствието на алгинови деривати

Съединение	**Алгинилсукцинат**	**Алгинамид**	**Метилалгинат**	**Натриев алгинат**
Aspergillus niger NBIMCC 3564	+	+	+	+
Candida tropicalis NBIMCC 8614	+	+	+	+
Helicobacter pylori NBIMCC 3731	+	+	-	+
Bacillus cereus NBIMCC 1085	+	-	-	+
Entherococcus faecalis NBIMCC 3915	+	-	-	+
Salmonella spp NBIMCC 1423	+	+	-	+

„+“ – съответният щам се развива в присъствието на деривата
„–“ – развитието на съответния щам е подтиснато от деривата

На снимките 1 и 2 са показани развитието и подтискането на Грам-положителните бактерии *Bacillus cereus NBIMCC 1085* в присъствието на алгинат и алгинови деривати. От показаните снимки се вижда ясно развитието и натрупването на биомаса от *Bacillus cereus* в присъствието на натриев алгинат и алгинилсукцинат (сн. 1) и липса на развитие в присъствие на алгинамид и метилалгинат (сн. 2).



Снимка 1. Развитие на *Bacillus cereus NBIMCC 1085* в присъствие на алгинови детиривати (натриев алгинат и алгинилсукцинат)



Снимка 2. Потискане развитието на *Bacillus cereus NBIMCC 1085* в присъствието на алгинамид и метилалгинат

6. Приложение на алгинатите в хранителната промишленост

Алгинатите имат структурноопределящи свойства и намират широко приложение при производството на различни хранителни продукти, като желеобразователи, емулгатори и стабилизатори. Едно от главните предимства на алгинатите е способността им да образуват желе.

Използването на алгинатите в хранителни продукти се препоръчва в присъствието на калциеви йони. Това води до модифициране на реологичните им свойства − повишаване на вискозитета или образуване на желираща структура.

6.1. Реологични характеристики на алгинатни желета

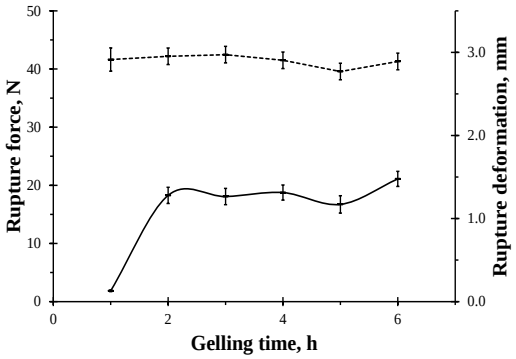
6.1.1. Структурно-механични и желиращи свойства на моделни разтвори на натриев алгинат

Проведени са изследвания за получаване на алгинатни перли с помощта на водни разтвори на натриев алгинат, калциеви соли и захароза. Разтворите на натриевия алгинат са с концентрация 3% и 6%, а източниците на калциеви йони са разтвори на калциев дихлорид с концентрация 10% и 20% и воден разтвор на калциев дилактат с концентрации 4% и 7%. Концентрацията на захарния разтвор е 65%.

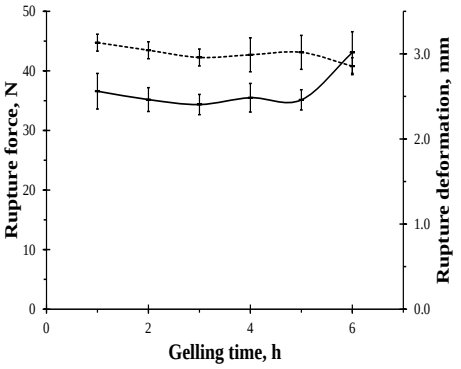
В резултат на проведените експерименти и получените резултати чрез статистическа обработка на 18 образци се установи, че най-голяма сила на разкъсване от 43,1 N притежават алгинатните перли, получени от 6% воден разтвор на натриев алгинат с 10% воден разтвор на калциев дихлорид при структуриращо време в разтвора от 6 часа, а най-малка сила на разкъсване от 4,3 N на алгинатните перли − при смесване на 3% воден разтвор на натриев алгинат с 7% воден разтвор на калциев дилактат и 65% воден разтвор на захароза при структуриращо време в разтвора от 1 час.

Най-голяма деформация на алгинатните перли от 3,1 mm се получава от 6% воден разтвор на натриев алгинат с 10% воден разтвор на калциев дихлорид при време на структуриране от 1 час, а най-малка деформация от 2,2 mm − при алгинатните перли, получени при следните два варианта: 3% воден разтвор на натриев алгинат с 4% воден разтвор на калциев дилактат и 65% разтвор на захароза за време 4 часа и 3% воден разтвор на натриев алгинат със 7% воден разтвор на калциев дилактат и 65% разтвор на захароза за структуриращо време от 5 часа.

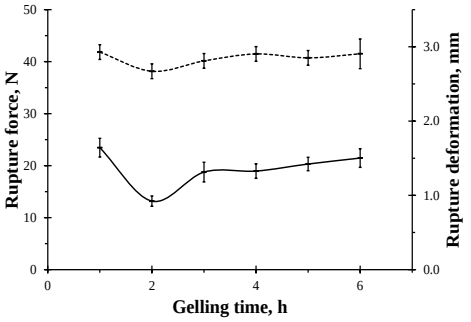
На фигура 11 са показани измененията на силата на разкъсване и деформацията с течение на времето на алгинатните перли, получени от разтвори на натриев алгинат и калциев дихлорид.



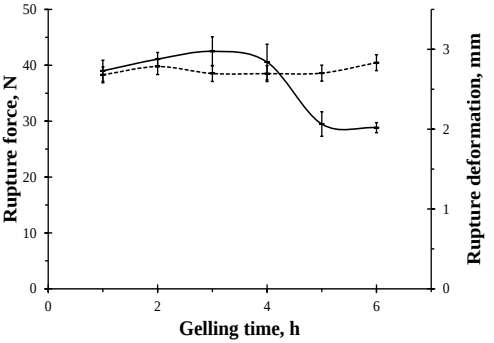
а) 3% Na-алгинат и 10% калциев дихлорид



б) 6% Na-алгинат и 10% калциев дихлорид



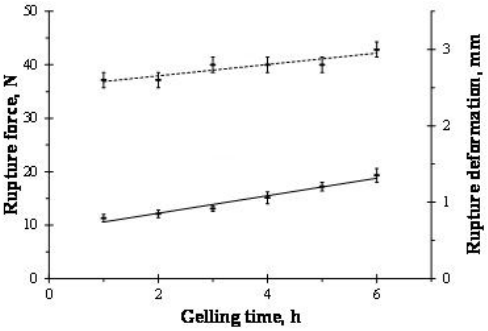
в) 3% Na-алгинат и 20% калциев дихлорид



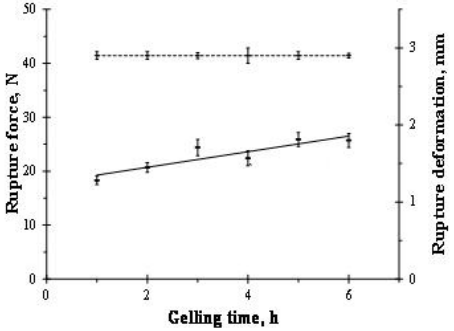
г) 6% Na-алгинат и 20% калциев дихлорид

Фигура 11. Разкъсваща сила (—) и деформация (---) на алгинатни перли като функция от структуриращото време

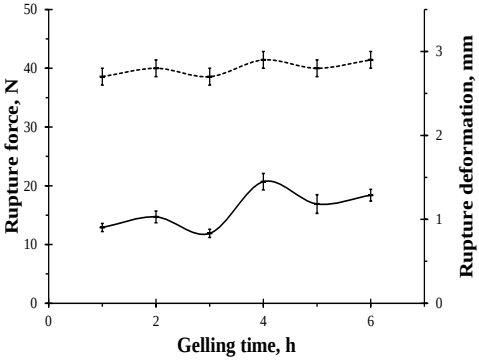
На фигура 12 са показани изменението на силата на разкъсване и деформацията с течение на времето на алгинатните перли, получени от водни разтвори на Na-алгинат и калциев дилактат. Силата на разкъсване и деформацията на алгинатните перли, получени от 3% Na-алгинат и 4% воден разтвор на калциев дилактат (фиг. 12-а) нараства с увеличаване на структуриращото време. Деформацията на алгинатните перли, получени при смесването на водни разтвори на 6% Na-алгинат и 4% калциев дилактат е непроменлива величинна (константа) − фиг. 12-б.



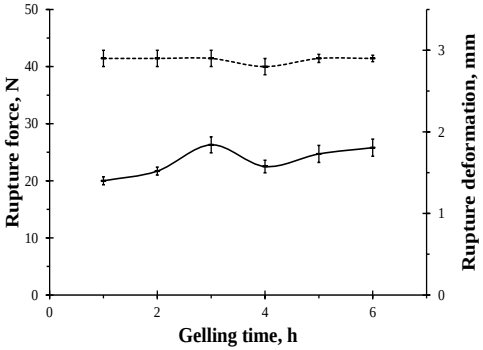
а) 3% Na-алгинат и 4% калциев дилактат



б) 6% Na-алгинат и 4% калциев дилактат



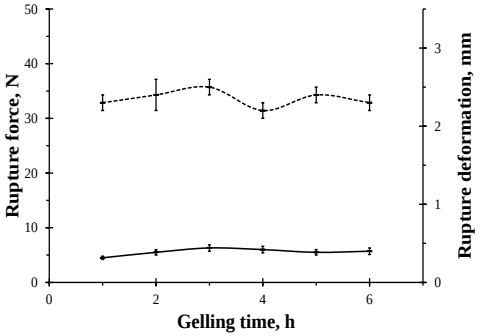
в) 3% Na-алгинат и 7% калциев дилактат



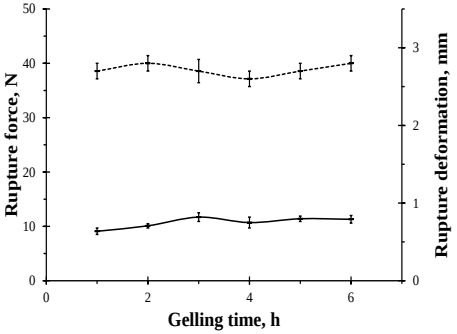
г) 6% Na-алгинат и 7% калциев дилактат

Фигура 12. Разкъсваща сила (—) и деформация (---) на алгинатни перли като функция от структуриращото време

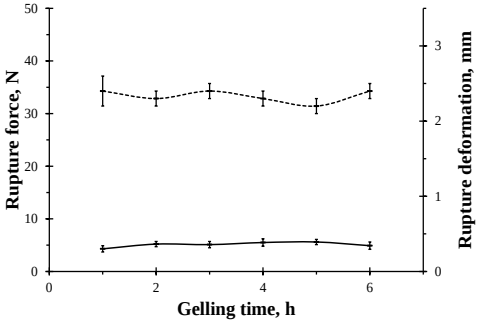
На фигура 13 са показани изменението на силата на разкъсване и деформацията с течение на времето на алгинатните перли, получени чрез водни разтвори на 3% и 6% Na- алгинат, 4% и 7% калциев дилактат и 65% добавена захароза.



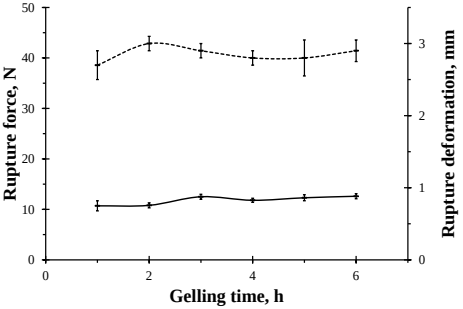
а) 3% Na-алгинат, 4% калциев дилактат и 65% р-р на захароза



б) 6% Na-алгинат, 4% калциев дилактат и 65% р-р на захароза



в) 3% Na-алгинат,7% калциев дилактат и 65% р-р на захароза



г) 6% Na-алгинат, 7% калциев дилактат и 65% р-р на захароза

Фигура 13. Разкъсваща сила (—) и деформация (---) на алгинатни перли със захароза като функция от структуриращото време

6.2. Реологични характеристики на нискокалорични алгинови желета

6.2.1. Влияние на вида на калциевите соли, концентрацията на калциеви йони и концентрацията на натриев алгинат върху реологични характеристики на нискокалорични алгинови желета

За определяне силата на разкъсване и деформация на моделни разтвори на нискокалорични алгинови желета са разработени варианти, при едно и също съдържание на захароза (10%) и структуриращо (желиращо) време (21 часа), при различни концентрации на натриев алгинат − 3% (табл. 7, 8) и 1,5% (табл. 9, 10) и калциеви йони от различни калциеви соли − калциев дилактат (табл. 7, 9) и калциев дихлорид (табл. 8, 10).

Таблица 7. Изменение силата на разкъсване и деформацията на нискокалорично желе с калциев дилактат при различна концентрация на калциеви йони

Нискокалорично желе	Ca^{2+} %	Разкъсваща сила, N	Деформация, mm
1 вариант	0,009	1,2	4,0
2 вариант	0,018	4,2	5,6
3 вариант	0,036	5,4	6,3

Таблица 8. Изменение силата на разкъсване и деформацията на нискокалорично желе с калциев дихлорид при различна концентрация на калциеви йони

Нискокалорично желе	Ca^{2+}, %	Разкъсваща сила, N	Деформация, mm
1 вариант	0,019	4,6	4,4
2 вариант	0,038	7,8	6,3
3 вариант	0,076	5,5	5,6

От данните в таблица 7 се вижда, че при използване на калциев дилактат като източник на калциеви йони, с увеличаване концентрацията на йоните от 0,009% до 0,036% силата на разкъсване на нискокалоричните желета нараства 4,5 пъти, а деформацията 1,3 пъти.

При формиране на желеобразна структура на нискокалорично желе с използване на източник на калциеви йони − калциев дихлорид (табл. 8) при концентрация на йони от 0,019 до 0,076%, най-голяма сила на разкъсване 7,8 N се получава при концентрация на калциевите йони 0,038%. За показателя деформация стойностите при различните концентрации са много близки.

При сравнителен анализ на получените данни за разкъсващата сила и деформация на нискокалоричните алгинови желета (фиг. 7, 8) при използване на различни концентрации на калциеви йони от различни калциеви соли се вижда, че при нарастване на концентрацията на калциевите йони 2 пъти − от 0,036% при използване на калциев дилактат (табл. 7) до 0,076% при калциев дихлорид (табл. 8), разкъсващата сила на алгиновото желе почти не се променя. При почти една и съща концентрация на калциевите йони за калциев дилактат и калциев дихлорид, съответно 0,036% и 0,038%, разкъсващата сила на алгиновото желе, получено с калциев дихлорид е с 2,4 N по-голяма от тази с калциев дилактат.

При 4,2 пъти увеличаване на концентрацията на калциевите йони − от 0,018% за калциев дилактат до 0,076% за калциев дихлорид, деформацията на нискокалоричното алгиново желе е една и съща – 5,6 mm.

Таблица 9. Изменение силата на разкъсване и деформацията на нискокалорично желе с калциев дилактат при различна концентрация на калциеви йони

Нискокалорично желе	**Ca^{2+}, %**	**Разкъсваща сила, N**	**Деформация, mm**
1 вариант	0,009	1,7	3,6
2 вариант	0,018	1,4	4,8
3 вариант	0,036	3,3	6,2

Таблица 10. Изменение силата на разкъсване и деформацията на нискокалорично желе с калциев дихлорид при различна концентрация на калциеви йони

Нискокалорично желе	Ca^{2+}, %	Разкъсваща сила, N	Деформация, mm
1 вариант	0,019	2,0	3,7
2 вариант	0,038	1,8	4,7
3 вариант	0,076	1,6	5,2

От получените резултати (табл. 9) се вижда, че най-голяма сила на разкъсване от 3,3 N и деформация от 6,2 mm има нискокалоричното желе при най-високата концентрация на калциеви йони от калциев дилактат − 0,036%. Увеличаване на концентрацията на калциевите йони четири пъти води до увеличаване на разкъсващата сила почти 2 пъти, а за деформацията − 1,7 пъти.

При нискокалоричните желета, получени с йони на калциев дихлорид (табл. 10) се наблюдава обратна тенденция. С увеличаване на концентрацията разкъсващата сила намалява, като при четирикратно увеличение на калциевите йони от 0,019% до 0,076% намаляването е незначително − от 2 до 1,6 N. Обратно, при деформацията има нарастване до 1,4 пъти.

Сравнявайки стойностите за разкъсващата сила на нискокалоричните желета от табл. 9 и 10, където концентрацията на разтвора на натриевия алгинат е два пъти по-ниска от тази в табл. 7 и 8, съответно 1,5% и 3% се вижда, че при калциев дилактат и концентрация на калциеви йони 0,018% и 0,036 % (табл. 7) разкъсващата сила е по-голяма, съответно 3 и 1,6 пъти, в сравнение с нискокалоричните желета (табл. 9). Същата тенденция се наблюдава и при нискокалоричните желета, получени с калциев дихлорид. При концентрация на калциеви йони 0,019%, 0,038% и 0,076%, (табл. 8) разкъсващата сила е по-голяма, съответно 2,3; 4,3 и 3,4 пъти, в сравнение с нискокалоричните желета (табл. 10). Това показва, че при по-ниски концентрации на разтвори на натриев алгинат и по-високи концентрации на калциеви йони се получават желета с по-слаба здравина. Това най-вероятно се дължи на невъзможността на малкото количество натриев алгинат да се свърже с наличното количество калциеви йони, да се получи необходимото

„омрежване” и оттам по-добра желеобразуваща структура и по-голяма здравина на получените нискокалорични желета.

6.3. Влияние на концентрацията на захароза върху реологични характеристики на нискозахарни алгинови желета

За определяне силата на разкъсване и деформация на моделни разтвори на нискокалорични алгинови желета са разработени варианти, при едно и също съдържание на натриев алгинат − 3%; захароза от 10% до 35%; 21 часа структуриращо (желиращо) време и еднаква концентрация на калциеви йони от различни калциеви соли (калциев дилактат - табл. 11 и калциев дихлорид - табл. 12).

От получените данни (табл. 11) се вижда, че при едно и също съдържание на калциеви йони и различна концентрация на захароза при нискозахарните желета с калциев дилактат най-високи стойности за разкъсваща сила се получава при най-ниска концентрация на захароза − 10%. За останалите концентрации на захароза от 15% до 35% не се наблюдава определена закономерност по отношение на разкъсващата сила. Това води до извода, че при алгинатните желета концентрацията на захароза няма ролята на такъв технологичен фактор при образуването на желеобразна структура, каквато има при желета, получени с пектин.

Таблица 11. Изменение силата на разкъсване и деформацията на нискозахарно алгиново желе с калциев дилактат при едно и също съдържание на калциеви йони, натриев алгинат и различно съдържание на захароза

Захароза, %	Ca^{2+}, %	Разкъсваща сила, N	Деформация, mm
10	0,018	3,9	5,1
15	0,018	2,5	5,5
20	0,018	3,1	5,0
25	0,018	2,2	6,1
30	0,018	2,2	5,3
35	0,018	2,9	5,4

Таблица 12. Изменение силата на разкъсване и деформацията на нискозахарно алгиново желе с калциев дихлорид при едно и също съдържание на калциеви йони, натриев алгинат и различно съдържание на захароза

Захароза, %	Ca^{2+}, %	Разкъсваща сила, N	Деформация, mm
10	0,038	7,4	6,8
15	0,038	4,7	5,6
20	0,038	5,4	6,8
25	0,038	4,9	5,3
30	0,038	3,4	5,3
35	0,038	4,6	5,2

Същата тенденция за разкъсващата сила се наблюдава и при нискозахарните желета (табл. 12) с калциев дихлорид, с тази разлика, че стойностите са от 1,5 до 1,9 пъти по-високи, което се обяснява с почти двойно по-високата концентрация на калциеви йони в сравнение с тези на калциев дилактат (табл. 11).

Деформациите при всички нискозахарни желета с калциев дилактат и с калциев дихлорид, за различните концентрации на захароза, са незначителни, което е доказателство, че еластичността на желетата не е повлияна от различната концентрация на захароза и от различното съдържание на калциеви йони.

6.4. Изследване влиянието на различни видове полизахариди върху реологията на алгинатни желета

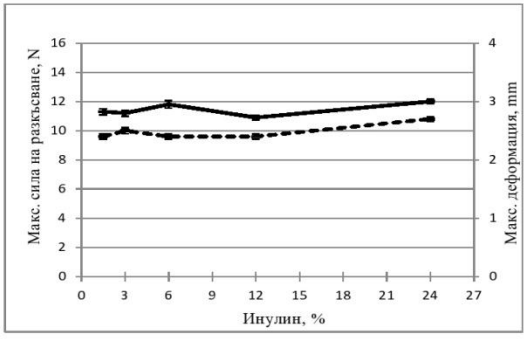
За изследване влиянието на различни видове полизахариди върху реологията на алгинатни желета са използвани инулин и амидиран ябълков пектин, едновременно с това са проведени и изследвания с добавка на хранителни пшеничени трици.

За установяване на желиращата сила са определени силата на разкъсване на алгинатни перли и деформацията им. Установяването на

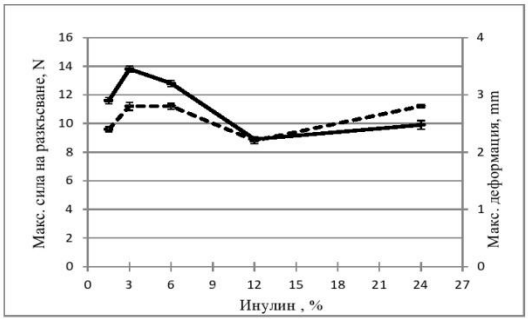
силата на разкъсване и деформацията на алгинатните перли се осъществи при съответните постоянни параметри на изследването − концентрация на натриев алгинат – 3%, калциев дихлорид и калциев дилактат с концентрации - 7%, инулин с различна степен на полимеризация (DP 7,12 и 22); нискоестерифициран амидиран ябълков пектин с различна концентрация и степен на естерификация - 42,75%; степен на амидиране - 23,08% и полиуронидно съдържание (чистота) - 60,10%. Пшенични трици с концентрация от 3% до 15%. Желиращото (структуриращо) време при всички изследвания е 4 часа при стайна температура.

На фиг. 14 са показани изменението на силата на разкъсване и деформацията на алгинатните перли, получени от разтвори на 3% натриев алгинат с добавен инулин с различна степен на полимеризация (DP) и 7% калциев дилактат. От получените резултати се установи, че независимо от степента на полимеризация на добавения инулин в концентрационния диапазон от 6% до 12%, силата на разкъсване е с тенденция към постепенно намаляване. При увеличаване на концентрацията на инулина от 12% до 24%, обратно, силата на разкъсване нараства плавно, в резултат на което се увеличават вискозните свойства на желиращата система и се проявява пластифициращ ефект. Тези резултати са в съответствие с резултатите на Nickerson and Paulson (2005), Loret et al. (2009), които доказват, че при увеличаване на съдържанието на инулин в к-карагенанов гел, той започва да изпълнява ролята на пластификатор, при което се засилват вискозните свойства на материала.

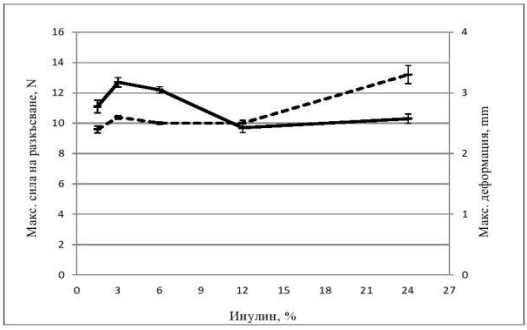
При показателя деформация се наблюдава същата тенденция − с увеличаване степента на полимеризация на прибавения инулин при концентрация 24% деформацията се увеличава от 2,7 до 3,3 mm. По подобен начин се увеличава остатъчната относителна деформация при прибавяне на инулин към к-карагенанов гел в резултат на пластифициращия ефект на инулина и засилването на вискозно-еластичното поведение на геловете (Harilaos et al., 2012).



а.) 3% Na-алгинат, инулин с DP7 и 7% калциев дилактат



б.) 3% Na-алгинат, инулин с DP12 и 7% калциев дилактат

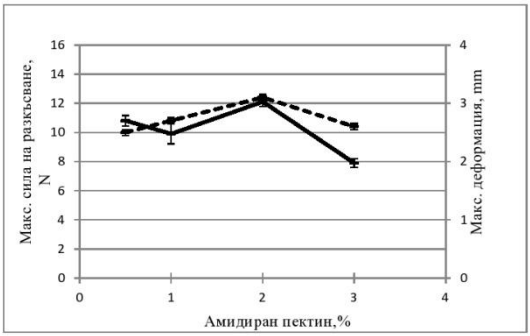


в.) 3% Na-алгинат, инулин с DP22 и 7% калциев дилактат

Фигура 14. Разкъсваща сила (—) и деформация (---) на алгинатни перли като функция от концентрацията на инулин с различна степен на полимеризация (DP)

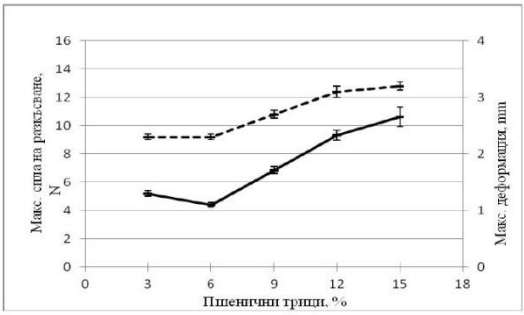
На фигура 15 е показано изменението на силата на разкъсване и деформацията на алгинатните перли чрез използването на комбинация от разтвори на натриев алгинат с концентрация 3% и 7% калциев дилактат при прибавяне на средно естерифициран амидиран ябълков пектин с концентрация 0,5%; 1%; 2% и 3%. От получените резултати се установи, че при добавяне на амидиран пектин от 0,5% до 2% текстурните свойства на алгинатните перли се подобряват (увеличава се силата на разкъсване и деформацията). При по-висока концентрация (от 2 до 3%) на средно естерифицирания амидиран пектин се наблюдава рязко намаляване на силата на разкъсване и влошаване текстурата на желиращата система (фиг. 15). Подобен ефект е наблюдаван при рибни продукти от други

автори (Uresti et al., 2003), които установяват, че прибавянето на 1% амидиран ниско естерифициран пектин води до увеличаване на текстурните свойства на тези продукти, а по-високите концентрации до разрушителен ефект на системата.

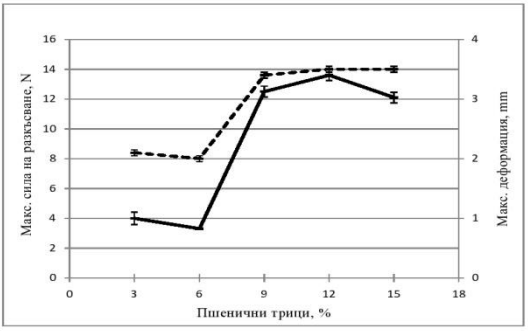


Фигура 15. Разкъсваща сила (—) и деформация (---) на алгинатни перли като функция от концентрацията на амидиран пектин

На фиг. 16 са показани изменението на силата на разкъсване и деформацията на алгинатните перли, получени чрез използването на комбинация от разтвори на натриев алгинат с концентрация 3%, с добавени пшенични трици от 3 до 15% и 7% калциев дилактат (фиг. 16-а) и същата комбинация със 7% калциев дихлорид (фиг. 16-б). От получените данни се вижда, че най-малка разкъсваща сила от 3,3 N и деформация от 2,0 mm имат алгинатните перли при концентрация 6% на пшеничните трици (фиг. 16-б), а най-голяма деформация от 3,5 mm − при концентрация на пшеничните трици от 12 до 15%. При увеличаване на концентрацията на пшеничните трици от 6 до 12%, при еднакво съдържание на калциеви соли, разкъсващата сила на алгинатните перли се увеличава 2 пъти (фиг. 16-а) и 4 пъти (фиг. 16-б). Тази разлика в увеличенията на силите на разкъсване на алгинатните перли се обяснява с факта, че са използвани различни калциеви соли, които имат различно съдържание на калциеви йони. Използваният 7% разтвор на калциев дихлорид има двойно по-висока концентрация на калциеви йони (27,26%) в сравнение с калциевия дилактат (13,0%).



а.) 3% Na-алгинат + пшенични трици и 7% калциев дилактат



б.) 3% Na-алгинат + пшенични трици и 7% калциев дихлорид

Фигура 16. Разкъсваща сила (—) и деформация (---) на алгинатни перли като функция от концентрацията на пшенични трици

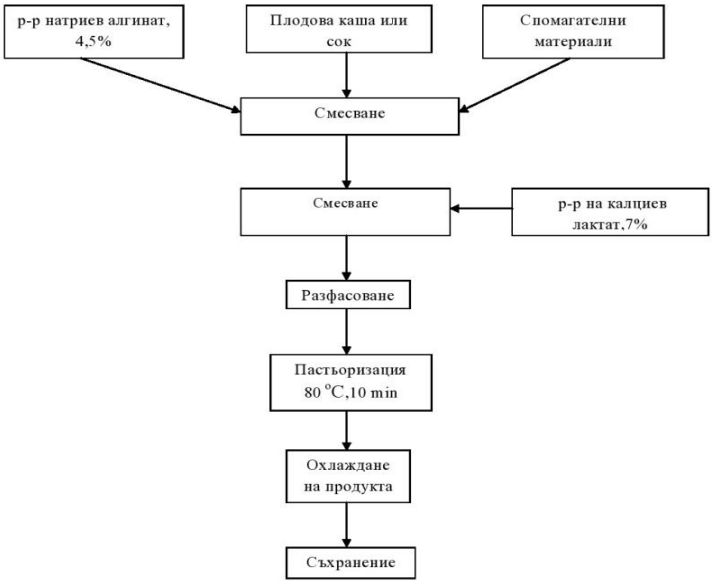
Деформацията и силата на разкъсване се повишават средно с 1,5 пъти (фиг. 16-б) при прибавяне на пшенични трици в определен концентрационен диапазон (9% - 15%) спрямо чистата модулна система (3% натриев алгинат и 7% калциев дихлорид при 4 часа желиращо време), чиято сила на разкъсване е 8,4 N и деформация 2,2 mm. Този факт се дължи на голямото съдържание на неразтворими хранителни влакнини, като целулоза, пентозани и полимери на базата на ксилоза и арабиноза, със здрава химична структура (Sramkova et al., 2009), които повишават здравината на алгинатните перли с пшенични трици.

- При изследване влиянието на различни видове полизахариди върху реологията на алгинатни желета се установи, че независимо от вида на използваните хранителни влакнини (инулин, амидиран ябълков пектин и пшенични трици), при една и съща концентрация от 3%, силата на

разкъсване се увеличава от 4,0 N до 13,8 N, а деформацията от 2,1 до 2,8 mm в следната последователност: алгинатни перли с пшенични трици и калциев дихлорид; алгинатни перли с пшенични трици и калциев дилактат; алгинатни перли с амидиран пектин; алгинатните перли с инулин DP 22 и алгинатни перли с инулин DP 12.

6.5. Приложение на алгинова киселина и нейните деривати за получаване на нискокалорични плодови желирани продукти

В резултат на многобройни проведени експерименти са разработени нискокалорични плодови желирани алгинатни перли на база бистри плодови сокове и нискокалорични плодови желирани продукти на база плодови каши. Плодовите желирани алгинатни перли са подходящи за декорация на сладкарски изделия, сладоледи, плодови салати и др. Нискокалоричните плодови желирани продукти са подходящи за болни от диабет и при затлъстяване.



Фигура 17. Обобщена блок схема за получаване на нискокалорични алгинови желирани продукти

6.5.1. Физичен и химичен анализ на нискокалорични плодови желирани продукти

Получени са нискокалорични алгинови желирани продукти на база плодова каша от къпини с добавка на 6% захароза и плодова каша от круши. В таблица 20 са представени резултатите от физикохимичния анализ на алгиновите желирани продукти по отношение на показателите сухо вещество, общи захари, pH, сила на разкъсване и деформация. От данните се вижда, че силата на разкъсване и деформацията на продуктите не са повлияни от вида на суровината, съдържанието на сухите вещества и съдържанието на общи захари.

Таблица 13. Физичен и химичен анализ на алгинови желирани продукти

Желирани продукти	Сухо в-во (тегловно) %	Общи захари %	Сила на разкъсване N	Деформация mm
от къпини	20,78	10,08	0,06	0,02
от круши	17,23	5,48	0,06	0,02

6.5.2. Органолетпична оценка на нискокалорични плодови желирани продукти

Проведен е сензорен анализ за получаване на органолептичен профил на нискокалоричен плодов желиран продукт. Определени са следните органолептични показатели: външен вид, цвят, вкус и мирис, концистенция и интензитет на сладост, киселинност, сочност и послевкус. От проведените сензорни анализи и обработка на получените данни въз основа на становищата на участниците се получи сензорна оценка на продуктите. Крайният резултат от проведените органолептични анализи е изобразен графично на фиг. 18 и 19.



Фигура 18. Органолептична оценка на желиран продукт от круши



19. Фигура Органолептична оценка на желиран продукт от къпини

Данните от фиг. 18 и 19 показват, че при сравнение на вариантите на желираните продукти (от круши и къпина) оценителите дават по-високи оценки на органолептичните качествени показатели на желирания продукт от круши. Средната обща оценка за вкус и мирис, както и за интензитет на сладост, киселинност, сочност и послевкус, дадена от дегустаторите е по-висока за желирания продукт от круши и по-ниска за продукта от къпини. От показаните диаграми се вижда, че сензорните показатели за цвят и консистенция са с по-високи средни оценки за продукта от къпини и по-ниски за този от круши. Като цяло в органолептичните профили на изпитваните продукти се наблюдават минимални разлики в сензорните оценки, дадени от оценителите.

6.5.3. Микробиологичен анализ на нискокалорични плодови желирани продукти

Проведени са микробиологични изследвания на продуктите след пастьоризация по отношение на плесени и дрожди; *E. coli* / 0,1 g, колиформи / g; *Salmonella*; *Staphylococcus aureus* / 0,1 g и определено общо микробно число КОЕ / g. Не се установи наличие на нито един от определените видове микроорганизми.

6.5.4. Алгиновите деривати - емулгатори на дисперсни системи

За използуване на алгиновите деривати като емулгатори на дисперсни ситеми се проведе изследване с напитка „айрян“, към която са прибавени разтвори от различни алгинови деривати − натриев алгинат, метилалгинат, алгинамид и алгинилсукцинат, в концентрация от 0,1% до 0,5%.

Таблица 14. Влияние на концентрацията на различни алгинови деривати върху стабилността на млечно - кисела напитка (айрян)

Алгинови деривати	Концентрация на алгиновите деривати %	Воден слой %	Млечнокисел слой %
Контрола	Без добавка на алгинов дериват	24,3	75,7
Натриев алгинат	0,1	6,1	93,9
Натриев алгинат	0,2	3,2	96,8
Натриев алгинат	0,3	1,6	98,4
Натриев алгинат	0,4	1,0	99,0
Натриев алгинат	0,5	0	100
Метилалгинат	0,1	18,2	81,8
Метилалгинат	0,2	15,2	84,8
Метилалгинат	0,3	15,2	84,8
Метилалгинат	0,4	9,1	90,9
Метилалгинат	0,5	0	100
Алгинамид	0,1	21,9	78,1
Алгинамид	0,2	18,2	81,8
Алгинамид	0,3	12,5	87,5
Алгинамид	0,4	6,3	93,7
Алгинамид	0,5	0	100
Алгинилсукцинат	0,1	18,2	81,8
Алгинилсукцинат	0,2	12,5	87,5
Алгинилсукцинат	0,3	3,2	96,8
Алгинилсукцинат	0,4	3,2	96,8
Алгинилсукцинат	0,5	0	100

От представените резултати в таблица 14 се вижда, че при концентрация 0,1% на метилалгината, 0,1% на алгинилсукцината и 0,2% на алгинамида обемите на водния и млечно-киселия слой са едни и същи, съответно 18,2% и 81,8%. Забелязва се също, че при увеличаване на концентрацията от 0,2% на 0,3% на метилалгинат се запазват едни и същи обемите на водния и млечно-киселия слой на емулсията − 15,2 % и 84,8%. Подобна еднаквост в обемите се наблюдава и при 0,2% алгинилсукцинат и 0,3% алгинамид − 12,5% и 87,5%, спрямо обема на цялата емулсия. При 0,2% натриев алгинат и 0,3% и 0,4% алгинилсукцинат също няма промени във водния и млечно-кисел слой, стойностите им и са съответно 3,2% и 96,8 %. Това показва, че при тези концентрации се постига еднаква стабилност на дисперсната система. Общата тенденция е, че с увеличаване концентрацията на алгиновите деривати, отделянето на водния слой намалява. Стабилност на дисперсната система се достига при концентрация 0,5 % за всички деривати.

ОБОБЩЕНИ ИЗВОДИ

1. Изследван е физикохимичния състав на кафяви водорасли *Cystoseira barbata* от различни Черноморски райони. Установи се, че географското местоположение оказва влияние върху физикохимичната им характеристика. Най-високо съдържание на алгинова киселина имат кафявите водорасли от района св. Атанас.

2. Различното съдържание на тежки метали дава основание за използване на водораслите като биомаркери за тестване чистотата на екосистемите, които обитават.

3. Разработен е модифициран метод на високотемпературна алкална екстракция на алгинова киселина от кафяви черноморски водорасли *Cystoseira barbata*. Методът се характеризира с получаване на алгинова киселина с високи качествени характеристики: високо полиуронидно съдържание (чистота), много добър външен вид (по отношение на показателя цвят) и по- висок добив на алгинова киселина.

4. Проведена е химична модификация на алгинова киселина и са получени алгиновите деривати: метилалгинат, алгинамид и алгинилсукцинат. Физикохимична и реологична характеристика на алгинати и алгинови деривати е определена чрез показателите: водна активност, характеристичен вискозитет, молекулна маса, степен на набъбване, степен на естерификация, полиуроново съдържание. Доказа се, че алгинамидът има най-високата водна активност, а натриевият алгинат − най-ниската. Алгинилсукцинатът има най-високия характеристичен вискозитет и молекулна маса, а алгинамидът − най-ниски стойности. Метилалгинатът има най-високите степени на статично набъбване, естерификация и полиуронидно съдържание, а алгинамидът − най-ниски стойности.

5. Алгиновите деривати проявяват по-висока пенообразуваща способност в сравнение с алгиновата киселина. Най-висока стабилност на пяната се получава с метилагината при най-ниска концентрация. Стабилността на пяната при метилалгината е 3 пъти по-голяма в сравнение с тази на алгиновата киселина. Алгиновите деривати могат да бъдат използвани за повишаване стабилността на пяната в хранителни продукти.

6. На заснети термограми са показани измененията в стойностите на енталпиите на модифицираните химични съединения на алгинова киселина при някои основни термични фазови процеси (преходи) в дадени температурни интервали; загуба на абсорбционно свързана вода; карамелизация, свързана със структурни промени и отделяне на вода и пиролиза (деполимеризация на полизахаридната верига). Установи се, че най-много вода се изпарява при температура от 60,5^{o}C до 121,2^{o}C при

алгинилсукцината, а най-малко при метилалгината в температурния интервал от 73,2°С до 96,0°С и, че алгинилсукцината има най-високата температура на термостабилност (90,84°С) и най-голямата стойност на енталпия при деполимеризация на полизахаридната верига.

7. Установи се, че от алгиновите деривати метилалгината проявява най-голямата инхибираща активност при концентрация 0,2%, спрямо четирите бактериални щама (*Helicobacter pylori, Bacillus cereus, Entherococcus faecalis, Salmonella spp*.). Същата активност има и алгининамида спрямо *Bacillus cereus, Entherococcus faecalis.*

8. Микробиологичните изследвания показват, че наличието на микроорганизми в алгиновите деривати са под границите на допустимите норми, а при някои напълно отсъстват (коаголазо-положителни стафилококи, *E.coli, Bac. cereus* и клостридии).

9. За първи път е изследвана и установена антимикробната активност на синтезираните алгинови деривати − метилалгинат и алгинамид върху Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии.

10. Доказано е, че образуването на желеобразна структура при нискокалоричните алгинови желета се влияе от концентрацията на натриев алгинат, от химичния състав и концентрацията на калциеви йони и не се влияе от концентрацията на захарния разтвор.

11. При по-ниска концентрация на разтвори на натриев алгинат разкъсващата сила, респективно здравината на нискокалоричните желета е по-ниска в сравнение с тези, получени при по-висока концентрация на натриев алгинат.

12. Нискокалорични желета с по-голяма здравина се получават при използване на калциев дихлорид в сравнение с калциев дилактат.

13. При едно и също съдържание на калциеви йони и различна концентрация на захароза при нискозахарните желета най-високи стойности за разкъсваща сила се получават при най-ниска концентрация на захароза − 10%.

14. Установи се, че промените в деформацията на нискокалоричните алгинови желета при различни концентрации на калциевите йони са незначителни и не се влияят от вида на калциевите соли.

15. Деформациите при всички нискозахарни желета с калциев дилактат и с калциев дихлорид за различните концентрации на захароза са незначителни, което е доказателство, че еластичността на желетата не е повлияна от различната концентрация на захароза и от вида различното съдържание на калциеви йони.

16. При изследване влиянието на различни видове полизахариди върху реологията на алгинатни желета се установи, че в зависимост от вида на използваните хранителни влакнини (инулин, амидиран ябълков пектин и пшенични трици), при една и съща концентрация от 3%, силата на разкъсване се увеличава от 4,0 N до 13,8 N, а деформацията от 2,1 до

2,8 mm в следната последователност: алгинатни перли с пшенични трици и калциев дихлорид; алгинатни перли с пшенични трици и калциев дилактат; алгинатни перли с амидиран пектин; алгинатните перли с инулин DP 22 и алгинатни перли с инулин DP 12.

17. Установи се, че алгинатите и алгиновите деривати стабилизират емулсии при ниски нива на концентрация от 0,5 %.

18. Разработена е технология за получаване на нискокалорични плодови алгинови желирани продукти.

НАУЧНИ И НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

1. За първи път е направена физикохимична характеристика на наши черноморски кафяви водорасли от вида *Cystoseira barbata* и е определено съдържанието на алгинова киселина.

2. Разработен е модифициран метод на високотемпературна алкална екстракция на алгинова киселина от кафяви черноморски водорасли *Cystoseira barbata*. Методът се характеризира с получаване на алгинова киселина с високи качествени характеристики: високо полиуронидно съдържание (чистота), много добър външен вид (по отношение на показателя цвят) и 3,6 пъти по-висок добив на алгинова киселина.

3. Проведена е химична модификация на алгинова киселина и са получени алгиновите деривати: метилалгинат, алгинамид и за първи път алгинилсукцинат.

4. Направена е физикохимична и реологична характеристика на алгинати и алгинови деривати чрез определените показатели: водна активност, характеристичен вискозитет, молекулна маса, степен на набъбване, степен на естерификация, полиуроново съдържание.

5. Установени са факторите, оказващи влияние върху желиращата способност на алгинатите.

6. Доказана е пенообразуващата и емулсионна способност на алгинатите.

7. Разработени са нискокалорични плодови алгинови желирани продукти и е направена физикохимична характеристика.

Списък на публикациите във връзка с дисертационната работа

1. Manev, Zdr., Denev, P., Zsivanovits, G.,Ludneva, D., (2013). Structural mechanical and gelling properties of alginate beads. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 19 (4), 775-779.

2. Manev, Zdr., Iliev, A., Vachkova, V., (2013). Chemical characterization of brown seaweed - *Cystoseira barbata*. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 19 (Supplement 1) 2013, 12-15.

3. Manev, Zdr., Petkova, N., Zhelyazkov, S., Denev, P., Ludneva D., (2014). Investigation the influence of dietary fiber on the rheology of alginate beads. Agricultural Science and Technology, ISSN 1313-8820, Vol. 7, (1), 137-140.