



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00471**

(22) Data de depozit: **01/08/2019**

(41) Data publicării cererii:
26/02/2021 BOPI nr. **2/2021**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA "DUNĂREA DE JOS"**
GALAȚI, STR. DOMNEASCĂ NR. 47,
GALAȚI, GL, RO

(72) Inventatori:
• **MILEA ȘTEFANIA ADELINA,**
STR.BARBOȘI NR.31, BL.B7, SC.3, AP.44,
MICRO17, GALAȚI, GL, RO;
• **RÂPEANU GABRIELA, STR.BRĂILEI**
NR.17, BL.R2, AP.53, GALAȚI, GL, RO;
• **BAHRIM GABRIELA ELENA,**
STR.PORTULUI NR.45, BL.MUREȘ, SC.2,
ET.3, AP.33, GALAȚI, GL, RO;

• **CRĂCIUNESCU OANA,**
BD.NICOLAE GRIGORESCU NR.33, BL.A 1,
SC.3, AP.33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **TATIA RODICA,**
STR.EROU ADRIAN FULGA NR.3,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **OANCEA ANCA, STR.PAȘCANI NR.5,**
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **STĂNCIUC NICOLETA,**
STR.NICOLAE IORGA,
COMUNA TUDOR VLADIMIRESCU, GL, RO

(54) **INGREDIENTE MULTIFUNCȚIONALE PE BAZĂ
DE EXTRACTE FLAVONOIDICE DIN COJI DE CEAPĂ
GALBENĂ ȘI BACTERII LACTICE CO-MICROÎNCAPSULATE
ȘI APLICAȚII ALE ACESTORA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor ingrediente multifuncționale utilizate în industria alimentară. Procedeu, conform invenției, constă în liofilizarea unui extract etanolic din coji de ceapă galbenă, având un conținut ridicat de compuși flavonoici, și bacterii lactice selecționate, într-o combinație de matrici de

co-încapsulare pe bază de proteine și hidrolizate proteice din zer, maltodextrină și pectină, rezultând produse naturale sub formă de pulbere fină, cu activitate antioxidantă și metabolică ridicată.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



Ingrediente multifuncționale pe bază de extracte flavonoidice din coji de ceapă galbenă și bacterii lactice co-microîncapsulate și aplicații ale acestora

Rezumat:

Invenția se referă la descrierea unui procedeu de obținere a unor ingrediente multifuncționale co-microîncapsulate prin liofilizare pe bază de extracte flavonoidice din coji de ceapă galbenă (*Allium cepa* L.), maltodextrină, pectină, proteine și peptide din zer și bacterii lactice. Ingredientele se obțin din proteine din zer, hidrolizate proteice din zer, maltodextrină și pectină ca materiale de încapsulare a extractelor etanolice din coji de ceapă galbenă, bogate în compuși biologic activi (flavonoide) și a bacteriilor lactice. Ingredientele microîncapsulate conțin peptide obținute prin hidroliza enzimatică a proteinelor din zer, recunoscute pentru activitatea lor biologică și funcțională excepțională, cum ar fi efecte benefice asupra sistemului imunitar, cardiovascular, nervos și gastrointestinal. De asemenea, în microparticulele obținute prin liofilizare au fost încorporate bacterii lactice, care prin proprietățile lor probiotice prezintă efecte pozitive binecunoscute pentru controlul infecțiilor intestinale, controlul nivelului de colesterol seric, îmbunătățirea metabolizării lactozei și activitatea anticarcinogenă, îmbunătățirea sistemului imunitar, prevenția gastroenteritelor.

Revendicări: 2

Figuri: 4

Descrierea invenției

Obiectul prezentei invenții îl constituie realizarea unui procedeu de obținere a unor ingrediente multifuncționale, co-microîncapsulate prin liofilizare, pe bază de extracte flavonoidice din coji de ceapă galbenă (*Allium cepa* L.), maltodextrină, pectină, proteine și peptide din zer și bacterii lactice. Scopul prezentei invenții este acela de a dezvolta ingrediente naturale, care încorporate în produse alimentare sau nutraceutice, să permită dezvoltarea de alimente cu funcționalitate ridicată, sănătoase. Se propune astfel dezvoltarea pe termen lung a unei culturi nutriționale, prin combinarea alimentației și a unui stil de viață sănătos, prin dezvoltarea și promovarea consumului de alimente funcționale, ținând cont de preferințele consumatorilor și de obișnuințele lor, legate de viață activă, economisirea de timp, hedonism.

Unul dintre obiectivele principale ale industriei alimentare este dezvoltarea de produse alimentare cu valoare adăugată, care să valorifice potențialul biologic activ al unor resurse naturale, cum ar fi de exemplu: fructe și legume, coji, semințe, pielețe, tescovină etc. Aceste resurse sunt obținute de la industrializarea fructelor și legumelor, fiind bogate în compuși biologic activi, pentru care există numeroase studii în literatura de specialitate referitoare la efectele pozitive

pentru sănătate. Dintre acești compuși se remarcă polifenolii, flavonoidele, antocianii, carotenoidele, acizii grași polinesaturați, tocoferolii etc. Marea majoritate a acestor compuși sunt metaboliți secundari, utilizați de plante în mecanisme de apărare și localizați de regulă în coji, pielețe, semințe etc. Prin urmare, concentrații importante de compuși biologic activi ajung în produse secundare și subproduse ale industriei alimentare, nefiind valorificate. Concomitent, în ultimii ani este evidentă necesitatea înlocuirii aditivilor artificiali cu cei naturali, determinată de creșterea exigențelor consumatorilor, care își doresc alimente cât mai naturale, cu inocuitate ridicată, obținute pe principiul *fresh like*, mai sănătoase, cu potențiale efecte benefice asupra sănătății. La acest trend se aliniază și industria alimentară, care manifestă interes pentru ingrediente multifuncționale, ca alternative naturale, atât pentru culoare, aromă dar și pentru alte funcții biologice, cum ar fi activitatea antioxidantă și probiotică.

Ceapa (*Allium cepa*), care este una dintre cele mai consumate legume în lume, conține o cantitate mare de compuși fenolici. Procesarea la scară industrială determină obținerea unei cantități mari de deșeuri, care poate genera unele probleme de contaminare a mediului înconjurător, deoarece promovează o creștere rapidă a unor agenți fitopatogeni, cum ar fi *Sclerotium cepivorum*, fără posibilități de utilizare în hrana animalelor sau tratarea solurilor (Roldán și colab., 2008). Prin urmare, este necesară dezvoltarea de tehnologii de procesare și valorificare a cojilor de ceapă pentru protecția mediului înconjurător, dar și pentru valorificarea compușilor naturali, bioactivi. Cojile de ceapă conțin compuși polifenolici, reprezentați în cea mai mare parte de quercetină, kaempferol și derivați de miricetină, sub formă de glicozide. În cojile de ceapă, concentrația de flavonoide este de circa 2-10 g/kg, mult mai mare comparativ cu conținutul de flavonoide regăsit în masa cepei (Albishi și colab., 2013). Quercetina, de exemplu, este un antioxidant puternic *in vitro* și, în plus, posedă proprietăți antiinflamatoare, antimicrobiene și anticancerigene (Gawlik-Dziki și colab., 2012). Datorită structurii moleculare, flavonoidele sunt compuși instabili la pH, temperatură, lumină, oxigen, prezența ionilor, acizilor, și a proteinelor etc, factori asociați procesării din industria alimentară.

Bacteriile lactice . Beneficiile pentru sănătate ale bacteriilor lactice, multe dintre acestea cu rol de probiotice, sunt cunoscute și demonstrate (Iannitti & Palmieri, 2010; Tiihonen și colab., 2010). Bacteriile lactice pot fi încorporate în produsele alimentare, având multiple beneficii *in vitro* și de asemenea *in vivo*. În prezent, culturile starter comerciale de bacterii lactice sunt încorporate în produsele alimentare comerciale, dintre cele mai diverse (de origine animală sau vegetală) (do Espírito Santo și colab., 2011). Cu toate acestea, proprietățile nutriționale și funcționalitatea produselor alimentare pot fi afectate negativ, ca urmare a condițiilor particulare de procesare sau depozitare (Burgain și colab., 2011). Pe de altă parte, în unele cazuri, ingestia de produse alimentare care conțin bacterii probiotice nu este eficientă fără o protecție adecvată împotriva unor condiții nefavorabile (de exemplu, pH-ul gastric). Multe bacterii probiotice nu au capacitatea de a supraviețui în condiții nefavorabile (temperatură și aciditate), asociate procesării sau depozitării.

Consumul produselor alimentare în care bacteriile lactice se înmulțesc în condiții naturale sau controlate, nu asigură întotdeauna o concentrație adecvată de celule vii carec *in vivo*, să inducă efecte benefice și evidente. Astfel, obținerea unor ingrediente funcționale care să conțină o concentrație ridicată și standardizată de bacterii lactice vii, oferă garanția funcționalității produselor în care ingredientele sunt utilizate. Prin metabolismul lor *in vitro*, bacteriile lactice produc o serie de compuși cu activitate antimicrobiană, care asigură conservabilitatea produselor și siguranța alimentară (acizi organici, peptide, compuși cu masă moleculară redusă etc.). Speciile *Lactobacillus bifermens* și *Lactobacillus plantarum* se caracterizează prin capacitatea de a produce compuși postbiotici cu rol benefic pentru consumatori (vitamine din grupul B, acid gama-amino butiric-GABA etc) și potențial antimicrobian, precum și capacitate de a se dezvolta în condiții biotehnologice simple, având capacitatea de a păstra viabilitatea timp îndelungat, în medii alimentare, în prezența de NaCl sau alți aditivi alimentari (Angelis și Gobbetti, 2016).

Microîncapsularea este o abordare sistematică utilizată pentru a asigura protecția componentelor sensibile, cum sunt compușii biologic activi și bacteriile lactice, împotriva condițiilor nefavorabile reprezentate atât de mediile de procesare, dar și de mediul digestiv. În general, microîncapsularea utilizând un singur material de protecție (proteine, polizaharide) s-a dovedit eficientă în a asigura protecția bacteriilor probiotice și compușilor biologic activi împotriva unor condiții adverse. Însă, combinația de matrici naturale cu proprietăți diferite conferă proprietăți de protecție îmbunătățite și caracteristici de eliberare superioare în condiții de depozitare obișnuită și în condiții gastrice (Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014).

Proteinele din zer au cea mai mare calitate nutrițională (Scor de aminoacizi corecți prin digestie cu proteine - PDCAAS = 1) (Dullius și colab., 2018). Proteinele din zer sunt bogate în aminoacizi esențiali, aminoacizi cu catena ramificată și aminoacizi cu sulf, promovând procesele de reglare metabolică și pliere a proteinelor. Proteinele din zer sunt reprezentate de: β -lactoglobulina (3.3 g/L din totalul proteinelor din lapte și α -lactalbumina (1.2 g/L), și componente minore, care includ serum albumina bovină (0.3 g/L), lactoferina bovină (0.1 g/L), immunoglobulinele (0.5-1 g/L), lactoperoxidaza (0.03 g/L) și glicomacropetidul (1.2 g/L). Proteinele din zer prezintă numeroase funcții biologice, la nivelul sistemului cardiovascular, digestiv, endocrin, imunitar și sistemului nervos. Adesea, proteinele din zer sunt descrise ca *proteine perfecte din punct de vedere nutrițional*, deoarece conțin toți aminoacizii esențiali și neesențiali necesari organismului uman.

Cu toate acestea, multe din proprietățile bioactive ale proteinelor din zer sunt criptate în secvențele lor native și astfel pot fi eliberate numai prin fragmentarea lanțului polipeptidic, de exemplu, prin hidroliza enzimatică (Pihlanto-Leppälä, 2000). Peptidele rezultate din hidroliza enzimatică a proteinelor din zer sunt recunoscute pentru activitatea lor biologică și funcțională excepțională, cum ar fi efecte benefice asupra sistemului imunitar, cardiovascular, nervos și gastrointestinal.

În literatura de specialitate au fost identificate o serie de brevete de invenție care valorifică potențialul nutrițional și funcțional al flavonoidelor și bacteriilor probiotice, după cum urmează:

WO2001049285A1, *Flavonoid drug and dosage form, its production and use*, este un patent care descrie o formulă medicală ce conține flavonoide pentru utilizări terapeutice, profilactice și paleative. Invenția respectivă utilizează pudră și/sau extract de ceapă, ceai verde, și/sau măr, și/sau struguri și/sau Gingo Biloba și pin.

Față de cele prezentate mai sus, invenția propusă se individualizează prin co-microîncapsularea prin liofilizare a unui extract flavonoidic din coji de ceapă galbenă (*Allium cepa* L.) împreună cu bacterii lactice, în materiale complexe formate din maltodextrină, pectină, proteine și peptide din zer, care să asigure protejarea compușilor biologic activi de efectele de degradare induse de condițiile de procesare, cum ar fi: regimul termic, lumina, oxigenul, pH-ul etc. De asemenea, comicroîncapsularea urmărește obținerea unei pudre cu stabilitate ridicată în timp, în ceea ce privește conținutul în compuși biologic activi și viabilitatea bacteriilor lactice, cu proprietăți multifuncționale ridicate, ușor de manipulat și depozitat.

Parametrii invenției

1. Obținerea extractului flavonoidic din coji de ceapă

Extractul din coji de ceapă s-a obținut prin extracție, utilizând 40 g de coji de ceapă galbenă și 1000 mL de apă ultrapură la temperatura de 70°C, timp de 2 ore de extracție, cu omogenizare la 500 rpm. În timpul extracției, temperatura amestecului a fost de 60°C±2°C. În urma extracției, s-a obținut un lichid de culoare galben-portocaliu închis, intens colorat. Extractul a fost centrifugat la 6000 rpm timp de 10 min, iar supernatantul caracterizat în ceea ce privește conținutul de polifenoli totali, flavonoide totale și activitate antioxidantă.

2. Obținerea hidrolizatelor proteice din zer

O soluție stoc de izolat proteic din zer (5% în 10 mM soluție tampon Tris-HCl, pH 8,0), după hidratare timp de 1 oră, la temperatura de 40°C, a fost supusă hidrolizei enzimatică cu α -chymotripsină (EC 3.4.21.2, Sigma Aldrich, Germania, activitate enzimatică de 350 U/mg proteină), în raport enzimă:substrat de 1:100, în condiții optime de hidroliză specifice enzimei utilizate (pH 8,0, temperatură 37°C, timp de două ore și jumătate), până la un grad de hidroliză de 9,5±0,5%. După hidroliză, enzima a fost inactivată prin tratament termic la temperatura de 95°C, timp de 15 min. Hidrolizatele proteice rezultate au fost păstrate la temperatura de -20°C.

3. Obținerea inoculului de bacterii lactice

Culturile stoc de bacterii lactice, *Lactobacillus bif fermentans* și *Lactobacillus plantarum*, conservate în stare congelată, în 40% glicerol, la temperatura de -75°C, sunt în gestiunea Colecției de microorganisme, cu indicativul MIUG, a Platformei Bioaliment, din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, din cadrul Universității „Dunărea de Jos” din Galați, România. Încadrarea

taxonomică a culturilor s-a realizat folosind MicroLog M System (Biolog, USA). Pentru utilizare, în prima etapă s-a obținut un preinocul prin cultivare în mediul Man Rogosa și Sharpe (MRS lichid), la temperatura de 37°C, timp de 24 de ore, în sistem staționar, în condiții de aerobioză. Un volum de 2% preinocul (cca. 1,8 densitatea optică a suspensiei, măsurată la lungimea de undă de 600 nm), s-a inoculat în mediul MRS lichid și s-a continuat cultivarea timp de 48 de ore, la temperatura de 37°C, în sistem staționar, în condiții de aerobioză. La sfârșitul cultivării, biomasa de celule s-a separat prin centrifugare la 9000 rpm, timp de 15 minute, la 4°C. Biomasa separată s-a suspendat în 20 mL de soluție sterilă 0,9% NaCl (ser fiziologic), iar apoi s-a recentrifugat, operația de spălare repetându-se de trei ori. O cantitate de 1 g de biomasă umedă s-a resuspendat apoi în 20 mL de apă utrapură, iar suspensia obținută a fost utilizată pentru co-microîncapsulare. Suspensia de bacterii lactice s-a utilizat în 2 variante, câte o singură cultură (*L. bifementans* sau *L. plantarum*) sau în culturi combinate, în proporție de 1:1.

4. Testarea biocompatibilității *in vitro* a ingredientelor multifuncționale

Biocompatibilitatea *in vitro* a ingredientelor multifuncționale a fost evaluată prin testarea acestora pe celule fibroblaste, folosind linia celulară stabilizată NCTC clona L929, conform standardului internațional de testare a citotoxicității SR EN ISO 10993-5/2009. În acest context, s-au investigat viabilitatea celulară și proliferarea celulară (testul Rosu Neutru) și morfologia celulelor (colorație Giemsa) cultivate în prezența variantelor obținute.

5. Procesul de obținere a ingredientelor multifuncționale

Pentru co-microîncapsularea extractului apos din coji de ceapă s-a utilizat liofilizarea ca tehnică principală și izolat proteic din zer, hidrolizate proteice din zer, pectină și maltodextrină, ca materiale de încapsulare și suspensia de bacterii lactice, în patru variante de lucru, prezentate în **Figurile 1-4**.

În principiu, în lichidul rezultat de la extracția flavonoidelor din cojile de ceapă (45 mL), s-au adăugat 15 mL de hidrolizat proteic, 2% izolat proteic din zer, 1% maltodextrină și 0,5% pectină. Probele au fost menținute pentru hidratare timp de 2 ore cu agitare la 500 rpm la temperatura de 40°C. Sterilizarea s-a realizat utilizând tehnica UV timp de 1 oră, apoi s-a adăugat 20 mL de suspensie de bacterii lactice, conform datelor și codificării din **Tabelul 1**.

Tabel 1. Denumirea și codificarea probelor conform culturilor de celule utilizate

Denumirea și codificarea probelor conform culturilor de celule utilizate	
M	20 mL apă ultrapură sterilă
B	20 mL suspensie <i>Lactobacillus bifementans</i>
P	20 mL suspensie <i>Lactobacillus plantarum</i>
BP	20 mL suspensie <i>Lactobacillus bifementans</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i> (1:1)

Probele au fost liofilizate cu ajutorul unui liofilizator tip CHRIST Alpha 1-4 LD plus (Germania), la temperatura de -42°C , sub presiune de 0,10 mBar, timp de 48 h. Ulterior, ingredientele rezultate a fost colectate, ambalată în sticle cu protecție UV și păstrate la temperatura de $4-6^{\circ}\text{C}$ până la caracterizare și utilizare.

6. Testarea ingredientelor multifuncționale în sisteme alimentare

Cele patru variante experimentale au fost testate prin adăugare în sisteme alimentare, fiind selectate ca model sosurile pe bază de iaurt, utilizate ca dressing-uri în diferite aplicații. Tehnologia de obținere a acestor sosuri este una simplă, presupunând următoarele: amestecarea în condiții adecvate de igienă a: 50 g de iaurt cu un conținut ridicat de grăsime și proteină, 0,2 g de pulbere de usturoi, 0,2 mg de pulbere de mărar și 0,1 g de sare. Pudrele multifuncționale au fost adăugate în concentrație de 1%.

Procesele tehnologice au fost realizate în cadrul *Centrului Integrat de Cercetare, Expertiză și Transfer Tehnologic pentru Industria Alimentară* de la Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea Dunărea de Jos din Galați (<https://erris.gov.ro/FOOD-BIOTECHNOLOGY>).

Biocompatibilitatea ingredientelor multifuncționale a fost evaluată în cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe Biologice, București (<https://erris.gov.ro/INSTITUTUL-NATIONAL-DE-CERCE-16>).

Experimente efectuate

Extractul din coji de ceapă galbenă, ingredientele multifuncționale și produsele testate au fost caracterizate fitochimic, în ceea ce privește conținutul de polifenoli totali, flavonoide totale, activitate antioxidantă și biocompatibilitate *in vitro*. Ingredientele multifuncționale și produsele testate au fost testate în plus și din punct de vedere microbiologic în ceea ce privește viabilitatea bacteriilor lactice. Profilul fitochimic și viabilitatea bacteriilor lactice au fost testate pe durata depozitării ingredientelor, în condiții de temperatura $4-6^{\circ}\text{C}$, timp de 30 zile. De asemenea, pentru a verifica stabilitatea ingredientelor în sistemele alimentare selectate, s-a testat profilul fitochimic și viabilitatea bacteriilor lactice pe o perioadă de depozitare de 21 de zile de depozitare a acestora, la temperaturi de $4-6^{\circ}\text{C}$.

1. Caracterizarea fitochimică a extractului din coji de ceapă galbenă

În **Tabelul 2** este prezentat profilul fitochimic al extractului apos obținut din cojile de ceapă galbenă. Metodele utilizate pentru determinarea conținutului de compuși biologic activi sunt: metoda Folin-Ciocalteu pentru determinarea conținutului de polifenoli totali (mg acid galic/g FW) (Giusti și Wrolstad, 2001), metoda cu clorură de aluminiu (Dewanto și colab., 2002) pentru determinarea conținutului de flavonoide totale (mg echivalenți quercitină/g) și metoda reducerii

radicalului 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) în prezența unui antioxidant (Yuan și al. 2013) pentru activitatea antioxidantă (mMol Trolox/g).

Tabel 2. Caracteristicile fitochimice ale extractului flavonoidic din coji de ceapă galbenă

Conținut	Valori
Conținut de polifenoli totali (mg acid galic/g)	50,21±0,10
Conținut de flavonoide totale (mg echivalenți quercitină/g)	21,68±0,69
Activitate antioxidantă (mMol Trolox/g)	250,81±6,76

Se poate observa din **Tabelul 2** că extractul flavonoidic din coji de ceapă galbenă a prezentat un conținut ridicat de polifenoli și flavonoide, care au determinat obținerea unei activități antioxidante semnificative.

2. Caracterizarea fitochimică, probiotică și citotoxică a ingredientelor co-microîncapsulate

Ingredientele multifuncționale obținute au fost testate pentru evaluarea caracteristicilor funcționale, rezultatele fiind prezentate în **Tabelul 3**.

Tabel 3. Caracteristicile funcționale ale ingredientelor formulate

Caracteristică	M	B	P	BP
Eficiența încapsulării flavonoidelor (%)	89,21±1,99	92,23±1,14	93,31±0,89	91,32±2,56
Conținut de polifenoli totali (mg AG/g S.U.)	16,42±0,06	17,40±0,83	17,73±1,59	18,40±0,68
Conținut de flavonoide totale (mg EQ/ g S.U.)	17,35±1,97	15,06±0,68	16,66±1,42	16,43±1,18
Activitate antioxidantă (mMol Trolox/g S.U.)	84,74±2,90	81,03±2,31	84,29±0,55	91,92±3,73
Eficiența încapsulării bacteriilor lactice (%)	-	84,18±2,12	71,2±2,17	76,63±3,11
Viabilitatea bacteriilor lactice (ufc/g SU)	-	1,94x10 ⁷	3,6x10 ⁷	2,57x10 ⁷

Așa cum se poate observa din **Tabelul 3**, nu există diferențe semnificative în ceea ce privește profilul fitochimic și eficiența încapsulării flavonoidelor în cele 4 variante experimentale. Se poate aprecia că tehnica de co-microîncapsulare și materialele utilizate au permis obținerea unor variante de pudre cu un conținut ridicat de compuși biologic activi și bacterii lactice, cu o eficiență de încapsulare ridicată. Prin urmare, toate variantele au prezentat valori remarcabile ale activității antioxidante. Diferențe semnificative au fost remarcate la eficiența încapsulării bacteriilor lactice, cu o eficiență mai mare pentru specia *Lactobacillus bif fermentans*. În ceea ce privește profilul microbiologic al probelor, evaluarea numărului de bacterii lactice în probele cu adaos de bacterii lactice (B, P și BP) a presupus scăderea numărului de bacterii din proba martor.

Pentru a susține multifuncționalitatea propusă pentru invenție, și anume activitatea antioxidantă ridicată și funcționalitatea bacteriilor lactice, ingredientele a fost testate pentru stabilitate la depozitare timp de 30 de zile, atât pentru profilul fitochimic cât și pentru viabilitatea bacteriilor lactice. Rezultatele sunt prezentate în **Tabelul 4**.

Tabel 4. Caracteristicile funcționale ale ingredientelor formulate după 30 de zile de depozitare

Caracteristici funcționale	M	B	P	BP
Conținut de polifenoli totali (mg AG/g S.U.)	15,52±0,60	12,89±0,38	15,03±0,53	14,33±0,51
Conținut de flavonoide totale (mg EQ/ g S.U.)	15,69±2,26	14,40±0,38	15,93±0,61	10,32±0,76
Activitate antioxidantă (mMol Trolox/g S.U.)	83,90±0,76	80,18±0,86	81,29±0,58	88,86±0,78
Viabilitatea bacteriilor lactice (ufc/g SU)	1,04x10 ²	1,90x10 ⁷	1,87x10 ⁶	2,56x10 ⁷

Depozitarea la temperaturi de 4-6°C, timp de 30 de zile, a determinat o scădere a conținutului de compuși biologic activi, în special în proba B, pentru conținutul de polifenoli totali (cu circa 26%) și în proba BP, pentru conținutul de flavonoide totale (cu circa 37%). Toate probele au păstrat o activitate antioxidantă, peste 80 mM Trolox/g S.U. Proba codificată P a prezentat o reducere cu 1 log a numărului de bacterii lactice la depozitare, în timp ce probele B și BP au prezentat o viabilitate de 100%. Rezultatele obținute la depozitarea controlată timp de 30 de zile sugerează că ingredientele multifuncționale obținute prin comicroîncapsulare prezintă un potențial remarcabil pentru utilizare în sisteme alimentare, dar și pentru dezvoltarea de nutraceutice.

Rezultatele evaluării biocompatibilității *in vitro* (Tabele 5 și 6) au demonstrat că toate variantele realizate au fost biocompatibile deoarece, comparativ cu proba martor (celule în mediul de cultură, fără produse), celulele cultivate în prezența ingredientelor multifuncționale au prezentat valori ridicate ale viabilității și proliferării, iar morfologia lor în cultură a fost normală, caracteristică fenotipului celulelor fibroblaste.

Tabel 5. Viabilitatea celulelor fibroblaste L929 cultivate în prezența ingredientelor multifuncționale timp de 24 h, determinată prin metoda cu Rosu Neutru (% din cultura martor)

Concentrații de ingredient multifuncțional	10	50	100	250
M	97,96	102,88	102,23	105,12
B	109,66	118,03	117,38	117,92
P	110,64	114,56	123,37	110,50
BP	100,84	112,35	112,64	112,50

Tabel 6. Viabilitatea celulelor fibroblaste L929 cultivate în prezența ingredientelor multifuncționale timp de 48 h, determinată prin metoda cu Rosu Neutru (% din cultura martor)

Concentrații de ingredient multifuncțional	10	50	100	250
M	94,35	109,91	115,19	102,99
B	131,13	133,07	131,45	120,04
P	100	106,94	107,62	105,76
BP	108,34	118,59	119,28	116,48

Din Tabele 5 și 6, s-au putut observa și concluziona următoarele:

Proba Martor a fost biocompatibilă pe domeniul 10-250 μg/mL după 24 ore și 48 de ore de cultivare. Valorile de viabilitate celulară au fost ușor crescute față de martorul netratat, ajungând până la 105% după 24 ore de cultivare și 115% după 48 ore de cultivare.

Proba B a fost biocompatibilă pe tot domeniul de concentrații testat după 24 ore și 48 ore de cultivare. Valorile de viabilitate celulară au fost semnificativ crescute față de martorul netratat, ajungând până la 118% la 24 ore de cultivare și 133% după 48 ore de cultivare.

Proba P a fost biocompatibilă, cu valori ale viabilității celulare crescute față de martorul netratat, ajungând până la valori la 123% la 24 ore de cultivare și 107% după 48 ore de cultivare.

Proba BP a fost biocompatibilă pe domeniul de concentrații 10-250 $\mu\text{g/mL}$, stimulând proliferarea celulară la concentrații de 50-250 $\mu\text{g/mL}$, atât după 24 ore de cultivare, dar și după 48 ore de cultivare. La aceste concentrații, valorile de viabilitate celulară au fost semnificativ mai mari comparativ cu martorul netratat, ajungând până la 112% la 24 ore de cultivare și 119% după 48 ore de cultivare.

3. Testarea ingredientelor comicroîncapsulate în sisteme alimentare

Cele patru variante experimentale de ingrediente multifuncționale au fost adăugate, în proporție de 1% în sosuri pe bază de iaurt, pentru care s-au testat: profilul fitochimic și lactic inițial și stabilitatea la depozitare, luând în considerare o perioadă de valabilitate medie de 21 de zile. Sosurile au fost depozitate în sticle cu protecție UV și depozitate pentru perioada menționată la 4-6°C. Sosurile derivate au păstrat sistemul de codificare aferent ingredientelor, adăugându-se litera S pentru a se evita confuziile. Rezultatele obținute inițial și după 21 de zile de depozitare sunt prezentate în **Tabelele 7 și 8**.

Tabel 7. Caracteristicile fitochimice și probiotice ale sosurilor cu valoare adăugată

Caracteristici fitochimice	SM	SB	SP	SBP
Conținut de polifenoli totali (mg AG/g S.U.)	4,89±0,08	5,72±0,54	5,86±0,36	7,22±0,67
Conținut de flavonoide totale (mg EQ/ g S.U.)	1,52±0,32	2,14±0,22	2,31±0,73	2,21±0,11
Activitate antioxidantă (mMol Trolox/g S.U.)	9,09±0,25	14,91±0,45	15,00±0,35	17,42±0,38
Viabilitatea bacteriilor lactice (ufc/g SU)	-	2,47x10 ⁶	1,10x10 ⁵	3,07x10 ⁶

Din **Tabelul 7**, se remarcă faptul că probele cu bacterii lactice au prezentat un conținut mai mare de compuși biologic activi și activitate antioxidantă mai mare.

Tabel 8. Caracteristicile funcționale ale sosurilor cu valoare adăugată, după 21 de zile de depozitare

Caracteristici funcționale	SM	SB	SP	SBP
Conținut de polifenoli totali (mg AG/g S.U.)	4,15±0,31	6,26±0,35	5,59±0,50	6,10±0,27
Conținut de flavonoide totale (mg EQ/ g S.U.)	2,54±0,43	2,74±0,25	2,78±0,42	2,97±0,46
Activitate antioxidantă (mMol Trolox/g S.U.)	6,32±0,14	11,41±1,11	12,79±1,36	13,29±0,35
Viabilitatea bacteriilor lactice (ufc/g SU)	6,85x10 ²	2,24x10 ⁵	1,34x10 ⁴	1,34x10 ⁵

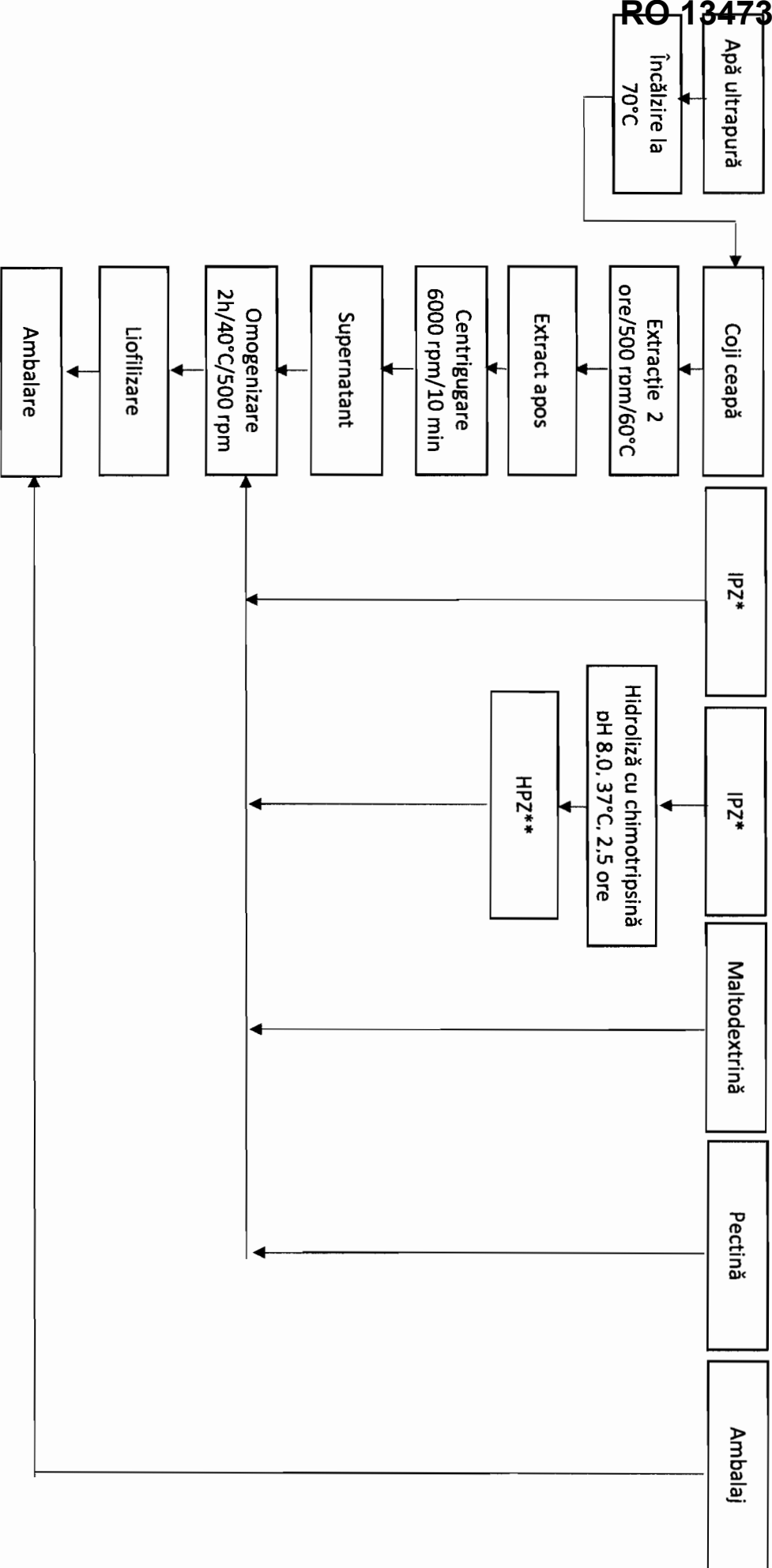
Din **Tabelul 8**, se poate observa că în timpul depozitării, ingredientele multifuncționale au prezentat un profil stabil, cu o cinetică de eliberare nesemnificativă a flavonoidelor din microcapsule și o scădere cu cca. 1 log a numărului de bacterii lactice.

Se poate aprecia că procesul de co-microîncapsulare a fost eficient în protejarea compușilor biologic activi și a bacteriilor lactice, fapt care a condus la obținerea unor valori remarcabile pentru activitatea antioxidantă și menținerea viabilității bacteriilor lactice, atât în ingredientele formulate, cât și în sosul de iaurt, după o perioadă îndelungată de păstrare (30 de zile).

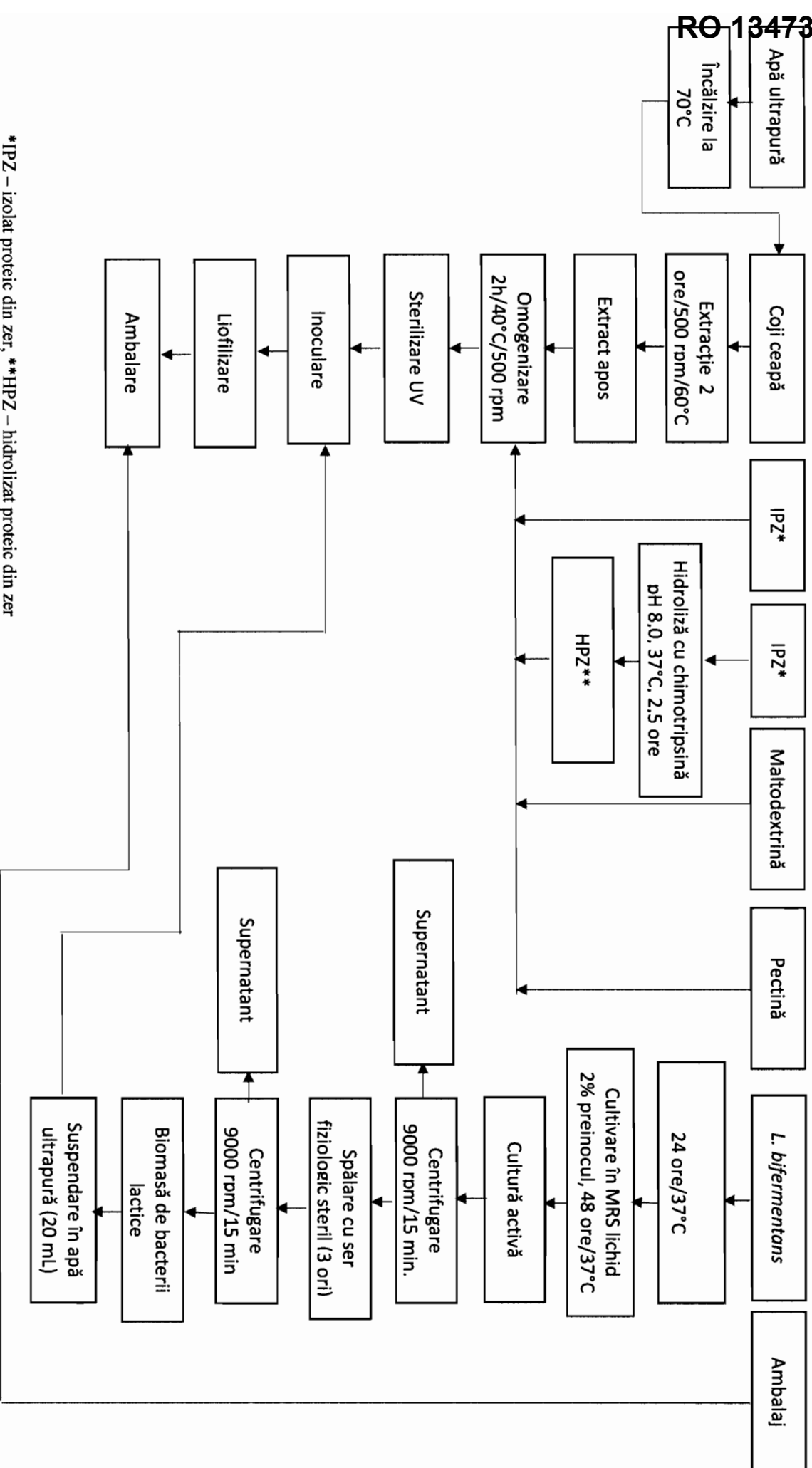
Concluzii

Rezultatele obținute în prezenta propunere de invenție susțin multifuncționalitatea ingredientelor co-microîncapsulate, obținute prin liofilizarea extractului etanolic din coji de ceapă galbenă, bogat în compuși flavonoidici și bacterii lactice selecționate, într-o combinație de matrici de co-microîncapsulare, care exploatează potențialul funcțional și tehnologic al proteinelor din zer, peptidelor, maltodextrinei și pectinei. Ingredientele obținute au prezentat valori ridicate ale eficienței de încapsulare, atât pentru compușii flavonoidici cât și pentru bacteriile lactice, demonstrându-se dubla funcționalitate prin activitatea antioxidantă și metabolică a bacteriilor lactice. Ingredientele au prezentat biocompatibilitate *in vitro*, toate cele patru variante prezentând valori ridicate ale viabilității și proliferării celulelor fibroblaste.

Ingredientele multifuncționale propuse reprezintă o alternativă viabilă la variantele de antioxidanți de sinteză și pot avea destinații multiple, cum ar fi industria alimentară, nutraceutice, industria farmaceutică sau cosmeceutică. Ingredientele multifuncționale au prezentat o bună stabilitate în sisteme alimentare, utilizarea acestora nefiind limitată de matrice sau concentrație. Totuși, pe baza experimentelor efectuate, autorii invenției propun adăugarea ingredientului multifuncțional în produse cu pH ușor acid (mai mic de 5,0), care să asigure o stabilitate ridicată a bacteriilor lactice, cum ar fi: iauturi, produse lactate fermentate, sosuri etc. Autorii propun adăugarea ingredientelor multifuncționale în concentrație cuprinsă între 1 și 5%.

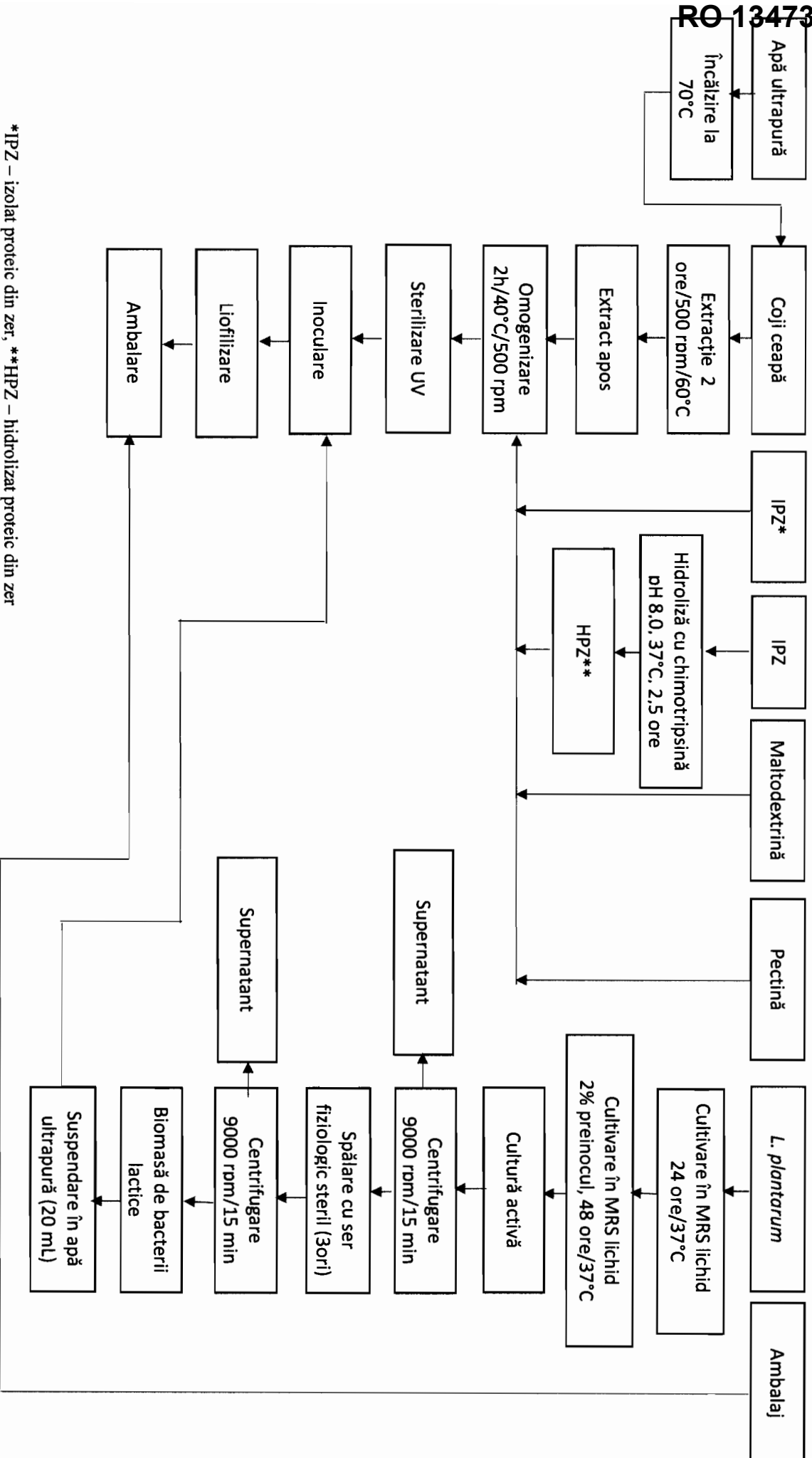


*IPZ – izolat proteic din zer, **HPZ – hidrolizat proteic din zer
Figura 1. Schema bloc de obținere a pudrei microîncapsulate pe bază de extract din coji de ceapă galbenă, proteine și hidrolizate proteice din zer, maltodextrină și pectină (Varianta M)



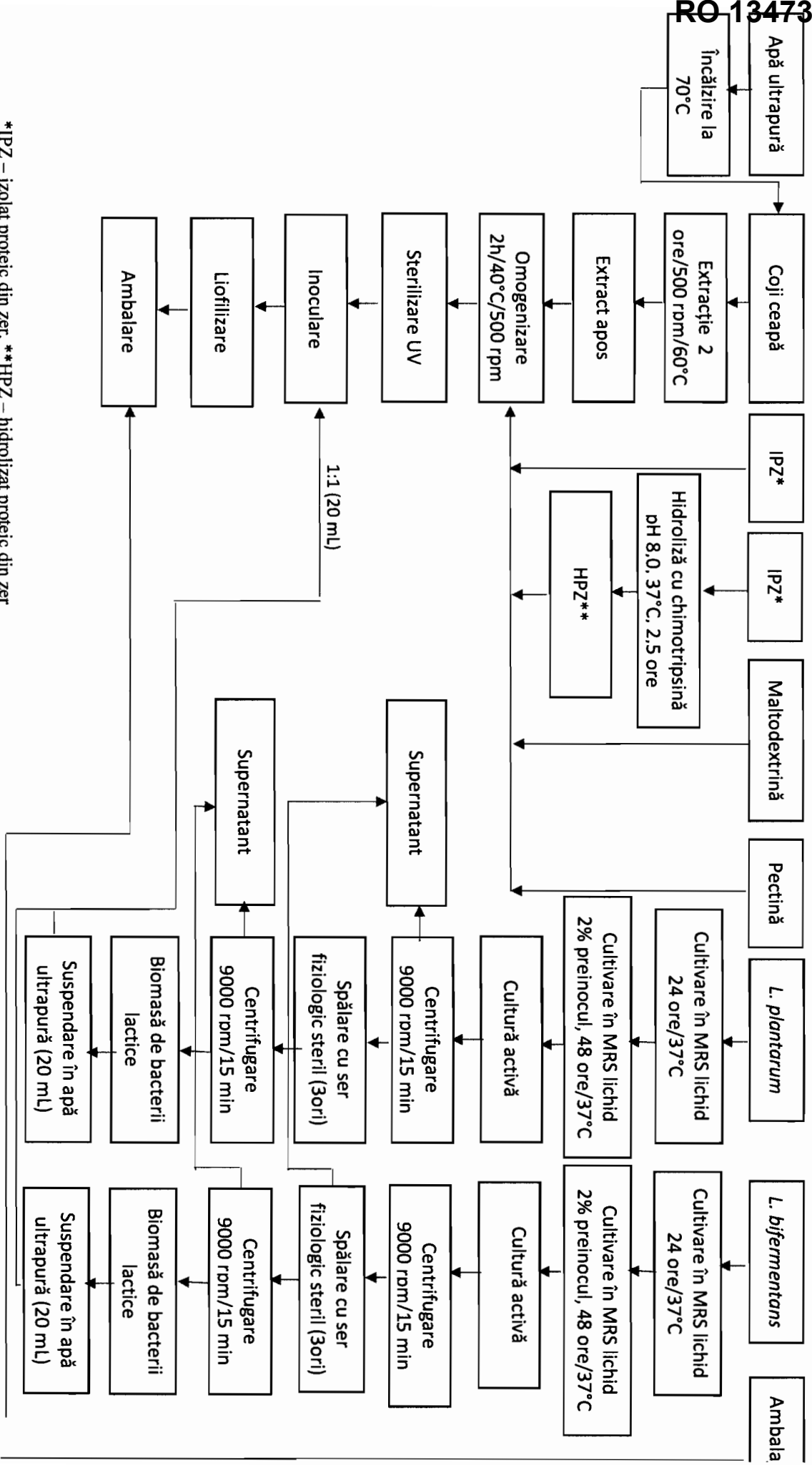
*IPZ – izolat proteic din zer, **HPZ – hidrolizat proteic din zer

Figura 2. Schema bloc de obținere a pudrei co-microîncapsulate pe bază de extract din coji de ceapă galbenă, proteine și hidrolizate proteice din zer, maltodextrină, pectină și biomasă de *Lactobacillus bifementans* (Varianta B)



*IPZ – izolat proteic din zer, **HPZ – hidrolizat proteic din zer

Figura 3. Schema bloc de obținere a pudrei co-microîncapsulate pe bază de extract din coji de ceapă galbenă, proteine și hidrolizate proteice din zer, maltodextrină, pectină și biomasă de *Lactobacillus plantarum* (Varianta P)



*IPZ – izolat proteic din zer, **HPZ – hidrolizat proteic din zer

Figura 4. Schema bloc de obținere a pudrei co-microîncapsulate pe bază de extract din coji de ceapă galbenă, proteine și hidrolizate proteice din zer, maltodextrină, pectină și biomasă de *Lactobacillus bifementans* și *Lactobacillus plantarum* (Varianta BP)

Referințe bibliografice:

- Albishi, T., John, J. A., Al-Khalifa, A. S., & Shahidi, F. (2013). Antioxidative phenolic constituents of skins of onion varieties and their activities. *Journal of Functional Foods*, 5(3), 1191–1203.
- AOAC (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Edn.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467–483.
- De Angelis, M. & Gobbetti, M. (2016). *Lactobacillus* spp: General Characteristics. Reference Module in Food Science, 1-12.
- Dewanto, V, Wu, X, Adom, KK, Liu, RH. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3010-3014.
- do Espírito Santo, A. P., Perego, P., Converti, A., & Oliveira, M. N. (2011). Influence of food matrices on probiotic viability – A review focusing on the fruity bases. *Trends in Food Science & Technology*, 22(7), 377-385.
- Gawlik-Dziki, U., Swieca, M., Dziki, D., Baraniak, B., Tomiło, J., & Czyz, J. (2012b). Quality and antioxidant properties of breads enriched with dry onion (*Allium cepa* L.) skin. *Food Chemistry*, 138(2), 1621-1628.
- Giusti, MM., Wrolstad, RE. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, RE, Acree, TE, An, H, Decker, E., Penner, MH, Reid, DS, Schwartz, SJ, Schoemaker, CE, Sporns, P (Eds.), Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley&Sons, New York, NY, pp. 1-13.
- Iannitti, T., & Palmieri, B. (2010). Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical Nutrition*, 29(6), 701-725.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177–187.
- Krasaekoopt, W., & Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 761-766.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 11(9), 347–356.
- Roldán, E., Sánchez-Moreno, C., Ancos, B., & Cano, M. P. (2008). Characterisation of onion (*Allium cepa* L.) by-products as food ingredients with antioxidant and antibrowning properties. *Food Chemistry*, 108(3), 907–916.
- Tiihonen, K., Ouwehand, A. C., & Rautonen, N. (2010). Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews*, 9(2), 107-116.
- Yuan, C, Du, L, Jin, Z, Xu, X. (2013). Storage stability and antioxidant activity of complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Carbohydrates Polymers*, 91, 385-389.

Revendicări

Invenția cuprinde 2 revendicări:

1. Revendicare independentă

Ingrediente multifuncționale pe bază de extracte flavonoidice din coajă de ceapă (*Allium cepa* L.), bacterii lactice selecționate, proteine și peptide din zer cu funcționalitate ridicată, în special activitate antioxidantă și metabolică benefică, caracterizate prin aceea că sunt obținute printr-un procedeu de co-microîncapsulare prin liofilizare, și se prezintă sunt formă de pudre fine, de culoare portocaliu-marونیu închis și oferă produselor în care sunt adăugate proprietăți funcționale.

2. Revendicare dependentă

Sosuri pe bază de iaurt cu valoare adăugată prin utilizarea ingredientelor multifuncționale pe bază de extracte flavonoidice din coajă de ceapă (*Allium cepa* L.), bacterii lactice selecționate, proteine și peptide din zer cu funcționalitate ridicată, caracterizate prin aceea că se prezintă sunt formă de produse de culoare portocaliu-marونیu deschis, cu proprietăți funcționale, în special activitate antioxidantă.