



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENTIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00261**

(22) Data de depozit: **13.04.2012**

(41) Data publicării cererii:
29.11.2013 BOPI nr. **11/2013**

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN
CLUJ- NAPOCA, CALEA MĂNĂȘTUR
NR.3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• VODNAR DAN CRISTIAN, STR. FABRICII
NR. 3, AP. 141, CLUJ NAPOCA, CJ, RO;
• SOCACIU CARMEN, STR.PLOPILOR
NR.10, AP.7, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **AMBALAJ BIOACTIV DE TIP FILM CU ACȚIUNE ANTIMICROBIANĂ, PROCEDEU DE OBȚINERE ȘI UTILIZĂRI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un ambalaj bioactiv sub formă de film, destinat reducerii microbiene de la suprafața produselor din carne din categoria "gata pentru consum", la un procedeu pentru obținerea acestuia, și la utilizarea sa pe durata perioadei de refrigerare a produselor. Ambalajul conform invenției conține, ca ingredient principal, 2% chitosan combinat cu extracte apoase din ceai verde și busuioc. Procedeul conform invenției constă din aceea că se amestecă chitosan

acidulat cu acid acetic glacial, cu extract apos de plante, amestecul se sterilizează la o temperatură de 110°C, timp de 10 min, se toarnă în forme care se usucă la o temperatură de 37°C, timp de 2 h, și se depozitează.

Revendicări: 5

Figuri: 5

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 inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



AMBALAJ BIOACTIV DE TIP FILM CU ACȚIUNE ANTIMICROBIANĂ, PROCEDEU DE OBȚINERE ȘI UTILIZĂRI

DESCREREA INVENTIEI

Invenția se referă la o gamă de ambalaje bioactive de tip film cu activitate antimicrobiană destinate ambalării produselor alimentare din carne, de tipul „gata pentru consum”, la procedeul de obținere al acestora și la utilizarea lor pe durata perioadei de refrigerare a produselor.

In scopul inhibării dezvoltării microbiene în alimentele de tipul „gata pentru consum” se cunoaște faptul că se adaugă substanțe cu acțiune antimicrobiană. Dezavantajul soluției prezentate este dat de către substanțele antimicrobiene care pot fi reduse sau inactivate datorită interacțiunii compușilor antibacterieni cu compușii din alimente. (Appendindi și colab., 2002; Neetoo și colab., 2007; Takahashi și colab., 2011).

Problema tehnică propusă spre rezolvare de prezenta inventie constă în realizarea unor ambalaje bioactive de tip film, eficiente pentru reducerea germenilor microbieni prin acțiunea lor la suprafața preparatelor din carne de tipul ”gata pentru consum”.

Ambalajele bioactive de tip film, înlătură dezvantajele menționate mai sus prin aceea că utilizează ca ingredient principal chitosanul (polimer natural obținut prin deacetilarea chitinei care este componentul major al exoscheletul crustaceelor) în concentrație de 2%, combinat cu extracte din plante (ceai verde, busuioc) în diferite concentrații, evitându-se astfel adaosul de aditivi obținuti prin sinteză chimică și interacțiunea acestora cu compoziția produsului.

Ambalajele bioactive de tip film, se prezintă sub forma unei mase plastice care aplicate pe suprafața preparatelor din carne de tipul ”gata pentru consum” nu le modifică acestora proprietățile senzoriale (gust, miros, culoare, consistență). Datorită consistenței, aceste ambalaje sunt ușor de utilizat.

Ambalajele prezintă în mod avantajos eliberarea controlată a substanțelor bioactive extrase din plante cu efect antimicrobian pe o perioadă mai mare de timp și cu acțiune la suprafața alimentului.

Ambalajele prezentate sunt realizate exclusiv pe bază de compuși nontoxici, biodegradabili și biocompatibili, folosind extracte apoase din plante.

Ideea inovatoare este pusă în evidență prin gama de ambalaje bioactive de tip film care reprezintă alternativa ambalajelor existente, prelungind stabilitatea produsului în condiții de

refrigerare, reducând incidența toxinfecțiilor alimentare prin consumul de alimente de tipul „gata pentru consum” și utilizând compuși naturali cu activitate antimicrobiană

În prezenta invenție, originalitatea se datorează formulării de ambalaje bioactive de tip film din chitosan, cu conținut de biomolecule din extracte vegetale de plante cu efecte antimicrobiene asupra produselor din carne de tipul „gata pentru consum” depozitate în condiții de refrigerare.

Procedeul de obținere în vederea realizării biofilmului este prezentat în figura 1. Plantele măcinate sunt infuzate în apă la temperatură de 100°C timp de 15 minute, iar chitosanul în concentrație de 2% este acidificat cu acid acetic glacial 0.7%. Extractul din plante filtrat și centrifugat se omogenizează împreună cu chitosanul acidificat. Amestecul obținut se sterilizează la 110 °C timp de 10 minute, apoi se răcește și se toară în forme. Amestecul turnat în forme se deshidratează la etuvă la 37°C timp de 4 ore. După procesul de deshidratare, de pe suprafața formelor se desprinde biofilmul format. Filmul se depozitează la 25°C în ambalaje din plastic ermetic inchise, până în momentul utilizării lor.

Descrierea pe scurt a etapelor de obținere a biofilmului sunt prezentate în tabelul 1:

Tabelul 1

Etape tehnologice la obținerea biofilmului (1-8)

Etapa	Denumirea etapei
Etapă I	Selecționarea și măcinarea plantelor uscate
Etapă II	Obținerea extractului limpede din plante prin decantări și filtrări succesive
Etapă III	Obținerea amestecului de chitosan acidificat cu acid acetic glacial
Etapă IV	Omogenizarea extractului de plante cu chitosan acidificat cu acid acetic glacial
Etapă V	Sterilizarea amestecului la 110 °C timp de 10 minute
Etapă VI	Turnarea în strat subțire a amestecului în forme
Etapă VII	Deshidratarea amestecului
Etapă VIII	Depozitarea biofilmului până în momentul utilizării lui pentru ambalare

Exemple de obținere a biofilmelor:

Exemplul 1: Biofilm din chitosan 2%

Se prepară 100 ml de produs din care se realizează 10 discuri de biofilm de dimensiunea 18cm^2 . Se amestecă 2 g chitosan acidifiat cu 0.7 ml de acid acetic glacial și se aduce la semn cu apă distilată. Conform schemei din figura 1, amestecul se sterilizează la 110°C timp de 10 minute după care se toarnă în plăci de diametrul 9 cm, sub formă de disc. Plăcile sunt expuse procesului de deshidratare la etuvă la 37°C timp de 4 ore. De pe suprafața plăcilor se despind discurile formate și se depozitează la temperaturi mai mici de 25°C și umiditate de maxim 40% până în momentul utilizării sale.

Exemplul 2: Biofilm din chitosan cu extract de ceai verde 2 %

Se prepară 100 ml de produs din care se realizează 10 discuri de biofilm de dimensiunea 18cm^2 . Extractul de ceai verde se obține prin infuzarea a 2 g de ceai verde deshidratat în 70 ml apă la temperatura de 100°C timp de 15 minute. Extractul se filtrează și apoi se amestecă cu 2 g chitosan acidifiat cu 0.7 ml de acid acetic glacial și se aduce la semn cu apă distilată. Conform schemei din figura 1, amestecul se sterilizează la 110°C timp de 10 minute după care se toarnă în plăci de diametrul 9 cm, sub formă de disc. Plăcile sunt expuse procesului de deshidratare la etuvă la 37°C timp de 4 ore. De pe suprafața plăcilor se despind discurile formate și se depozitează la temperaturi mai mici de 25°C și umiditate de maxim 40% până în momentul utilizării sale.

Exemplul 3: Biofilm din chitosan cu extract de ceai verde 4%

Se prepară 100 ml de produs din care se realizează 10 discuri de biofilm de dimensiunea 18cm^2 . Extractul de ceai verde se obține prin infuzarea a 4 g de ceai verde deshidratat în 70 ml la temperatura de 100°C timp de 15 minute. Extractul se filtrează și apoi se amestecă cu 2 g chitosan acidifiat cu 0.7 ml de acid acetic glacial și se aduce la semn cu apă distilată. Conform schemei din figura 1, amestecul se sterilizează la 110°C timp de 10 minute după care se toarnă în plăci de diametrul 9 cm, sub formă de disc. Plăcile sunt expuse procesului de deshidratare la etuvă la 37°C timp de 4 ore. De pe suprafața plăcilor se despind discurile formate și se depozitează la temperaturi mai mici de 25°C și umiditate de maxim 40% până în momentul utilizării sale.

Exemplul 4: Biofilm din chitosan cu extract de ceai verde 4% și busuioc 2%

Se prepară 100 ml de produs din care se realizează 10 discuri de biofilm de dimensiunea 18cm². Extractul de ceai verde și busuioc se obține prin infuzarea a 4 g de ceai verde deshidratat și a 2 g de busuioc deshidratat în 70 ml apă la temperatura de 100°C timp de 15 minute. Extractul se filtrează și apoi se amestecă cu 2 g pudră de chitosan acidificat cu 0.7 ml de acid acetic glacial și se aduce la semn cu apă distilată. Conform schemei din figura 1, amestecul se sterilizează la 110°C timp de 10 minute după care se toarnă în plăci de diametrul 19 mm, sub formă de disc. Plăcile sunt expuse procesului de deshidratare la etuvă la 37°C timp de 4 ore. De pe suprafața plăcilor se despind discurile formate și se depozitează la temperaturi mai mici de 25°C și umiditate de maxim 40% până în momentul utilizării sale.

Se menționează în continuare explicația figurilor 1-5.

Figura 1. Schema tehnologică de obținere a biofilmului

Figura 2 Amprente spectrofotométrice specifice extractelor din plante utilizate în realizarea biofilmelor din exemplele 2-4.

Figura 3. Amprente cromatografice specifice extractelor din plante utilizate în realizarea biofilmelor din exemplele 2-4.

Figura 4. Amprente FTIR specifice biofilmelor prezentate în exemplele 1-4.

Figura 5. Efectul inhibitor al biofilmelor prezentate în exemplele 1-4, asupra creșterii *L. monocytogenes* pe perioada de refrigerare

Caracterizarea extractelor utilizate la realizarea biofilmului

Pentru a recunoaște profilul biochimic al extractelor utilizate, s-au înregistrat spectrele moleculare UV-Vis, evidențiindu-se maximele specifice compușilor fenolici ($\lambda = 280$ nm) prezentate în figura 2.

Prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) s-au evidențiat amprente specifice extractelor utilizate în realizarea biofilmelor prezentate în exemplele 2-4 (figura 3) cu evidențierea compușilor fenolici ($\lambda=280$ nm) de tipul catechinelor prezentate în tabelul 2. Concentrația de catechine identificate crește progresiv în extractele utilizate în exemplul 2-4 odată cu creșterea conținutului în extracte din plante.

Tabelul 2

Compușii fenolici identificați în extractele utilizate la realizarea biofilmelor din exemplele 2-4.

Nr. semnal	Denumire compus fenolic	Timp de retenție (t _R)	Conținut mg%		
			Exemplul 2	Exemplul 3	Exemplul 4
1.	Gallocatechina	5.76	1.8	3.2	3.4
2.	Catechina	11.150	4.4	8.2	9.02
3.	Epigallocatechina	12.12	4.3	8.6	8.89
4.	Gallocatechingalat	17.660	0.35	0.71	0.72
5.	Epicatechingalat	20.75	1.87	3.52	3.64
6.	Catechingalat	21.6	0.1	0.3	0.4

Prin spectroscopia IR au fost identificate în biofilmele prezентate în exemplele 1-4, următoarele benzi specifice pentru grupările O-H (2800-2900 cm⁻¹), prezența polizaharidelor se identifică prin benzile de la 1155-1032 cm⁻¹. O altă bandă de absorpție s-a identificat la 1598 cm⁻¹, caracteristică prezenței grupării amino (-NH₂). Benzile de la 1654 cm⁻¹ și 1317 cm⁻¹ sunt caracteristice amidei I și amidei II, specifice nediacetilării în întregime a chitosanului.

Capacitatea antimicbiană a biofilmelor

Studii experimentale.

În vederea demonstrării capacității antimicrobiene a biofilmelor prezентate anterior, s-au realizat studii experimentale în triplicat pentru fiecare tip de biofilm prezентat în exemplele 1-4. Capacitatea antimicbiană exercitată de biofilme a fost determinată pe produsul de tip „gata de consum” și anume pe fritura din pulpă de porc ambalată sub vid, timp de 8 săptămâni. Inițial, bucăți de fritură de 12 cm² au fost inoculate cu 3*10³ CFU/cm² de *L. monocytogenes*. Probele au fost ambalate în biofilme iar apoi supuse ambalării în nylon/polyetylена cu ajutorul aparatului de ambalare în condiții de vacum. Produsele au fost depozitate la 4°C timp de 8 săptămâni, prelevându-se în fiecare săptămână probe, în vederea cuantificării densității de *L. monocytogenes*.

Rezultate.

Conform figurii 5, proba Martor (ambalare fără biofilm) în 8 săptămâni de la inoculare ajunge să-și dubleze încărcătura micbiană. În cazul biofilmului prezentat în exemplul 1 (ambalare cu biofilm de chitosan), eficiența este mai mare în primele 6 săptămâni urmând ca în

săptămâna 7 și 8 să se înregistreze o creștere în densitate bacteriană. În cazul biofilmelor prezentate în exemplele 2,3,4 care utilizează extracte de plante ca inhibatori microbieni, se prezintă cea mai bună acțiune antilisterică, ducând la înjumătățirea încărcăturii inițiale.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- reducerea microbiană din produsele din carne de tip „gata pentru consum”
- evitarea utilizării substanțelor de sinteză chimică ca aditivi antimicrobieni
- biodegradabilitatea ambalajelor
- acțiunea antimicrobiană la suprafața produselor
- incidența de toxioinfecții alimentare

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- Appendini P, Hotchkiss JH. 2002. Review of antimicrobial food packaging. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 3,113-126.
- Neetoo H, Ye M. Chen H. 2007. The effectiveness and shelf-life of plastic films coated with nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 70, 1267-1271.
- Takahashi H, Kashimura M, Miya S, Kuramoto S, Koiso H, Kuda T, Kimura B. 2011. Effect of paired antimicrobial combinations on *Listeria monocytogenes* growth inhibition in ready-to-eat seafood products. Food Control. 26, 397-400.

REVENDICĂRI

1. Ambalaj activ de tip biofilm cu acțiune antimicrobiană **caracterizat prin aceea că** este constituit din chitosan 2%, ceai verde 4%, busuioc 2%.
2. Ambalaj activ de tip biofilm cu acțiune antimicrobiană **caracterizat prin aceea că** este constituit din chitosan 2%, ceai verde 2-4%.
3. Ambalaj activ de tip biofilm cu acțiune antimicrobiană **caracterizat prin aceea că** este constituit din chitosan 2%.
4. Procedeu de obținere a unui număr de patru ambalaje de tip biofilm, definite în revendicările 1,2,3,4, **caracterizat prin aceea că** se prepară un amestec de chitosan 2% acidifiat cu acid acetic glacial 0.7%, cu extractul apos de plante (ceai verde: 2% sau 4%, busuioc 2%) care se sterilizează (110°C, 10 min) se toară în forme, se deshidratează (37 °C , 2 ore) iar apoi se depozitează la maxim 25°C, în ambalaje din plastic care să nu permită umidificarea lor.
5. Utilizarea biofilmelor definite în revendicările 1,2,3,4, pentru ambalarea alimentelor sau ca parte constituentă dintr-un ambalaj alimentar datorită efectului lor antimicrobian.

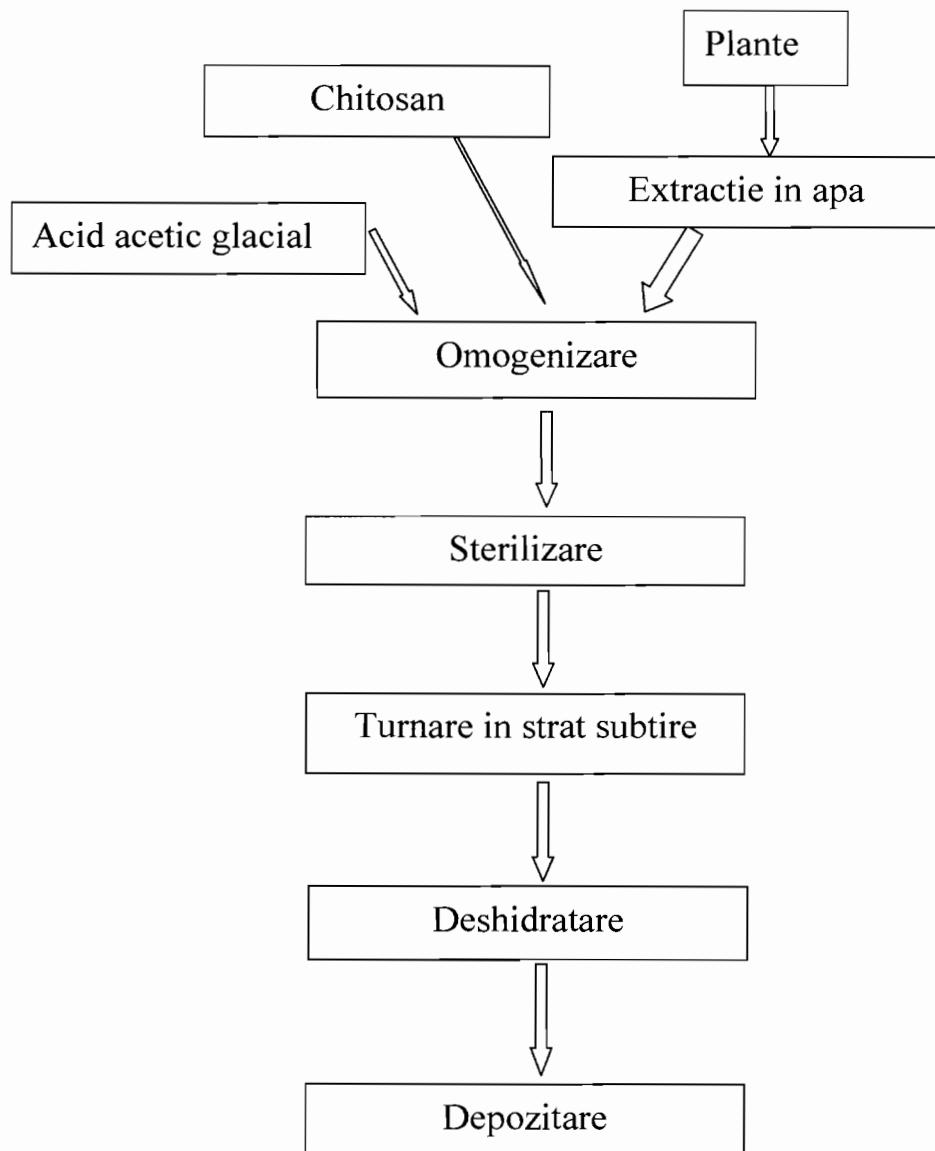
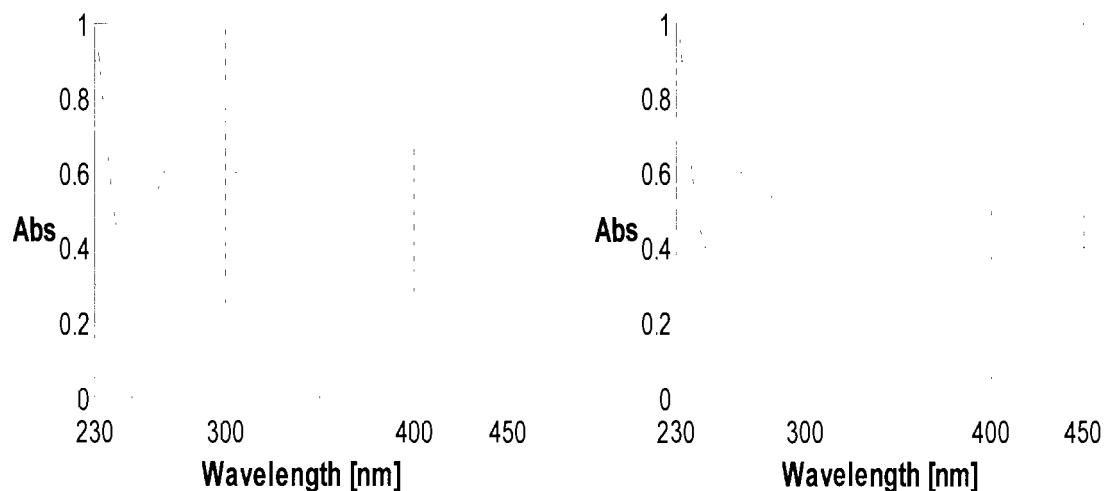
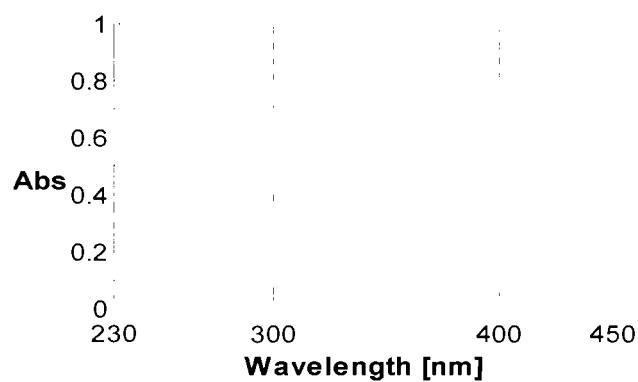
DESENE EXPLICATIVE

Figura 1



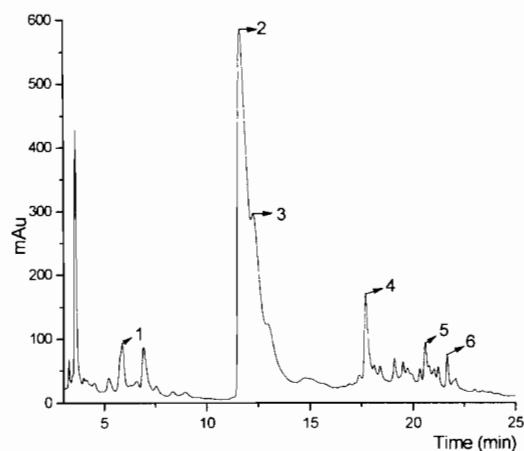
Amprenta spectofotometrică specifică extractului de ceai verde (2%) utilizat în realizarea biofilmului din exemplul 2.

Amprenta spectofotometrică specifică extractului de ceai verde (4%) utilizat în realizarea biofilmului din exemplul 3.

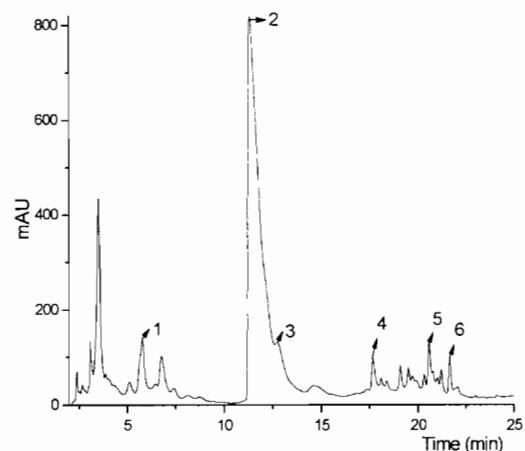


Amprenta spectofotometrică specifică extractului de ceai verde (4%) și busuioc (2%) utilizat în realizarea biofilmului din exemplul 4.

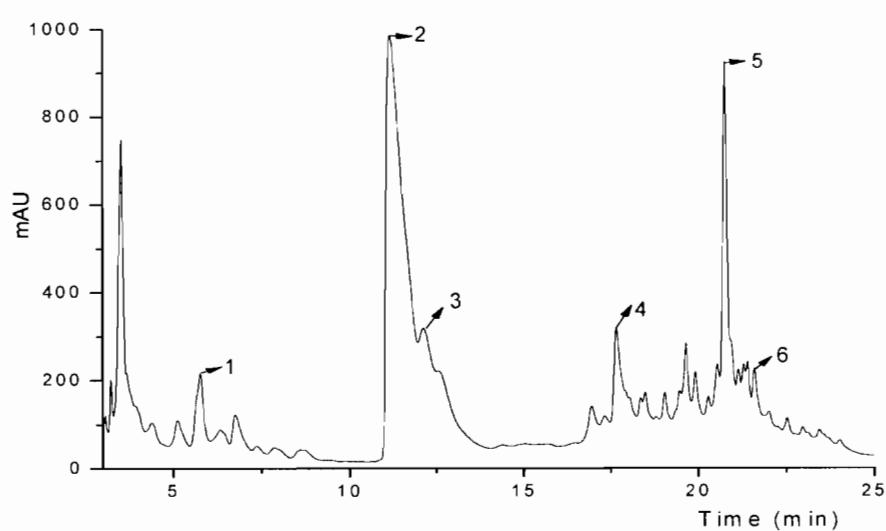
Figura 2



Amprenta chromatografică specifică extractului de ceai verde (2%) utilizat în realizarea biofilmului din exemplul 2

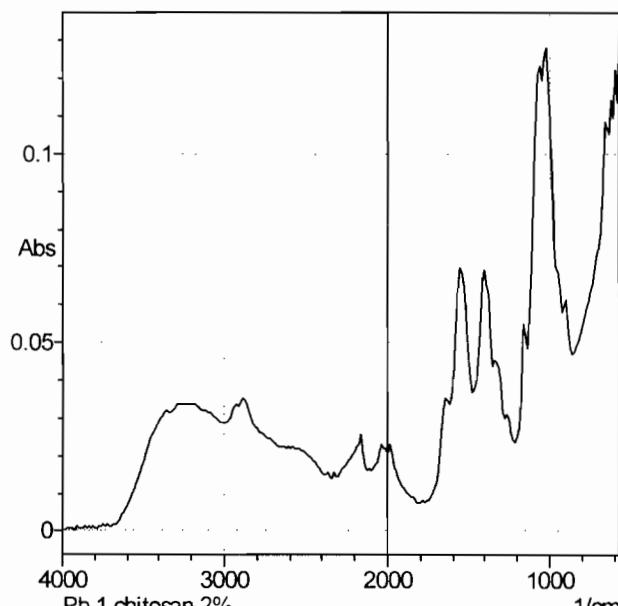


Amprenta chromatografică specifică extractului de ceai verde (4%) utilizat în realizarea biofilmului din exemplul 3

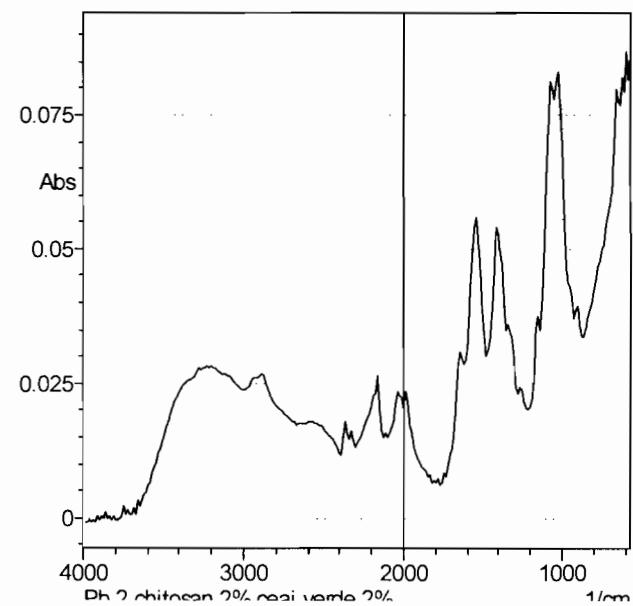


Amprenta chromatografică specifică extractului de ceai verde (4%) și busuioc (2%) utilizat în realizarea biofilmului din exemplul 4

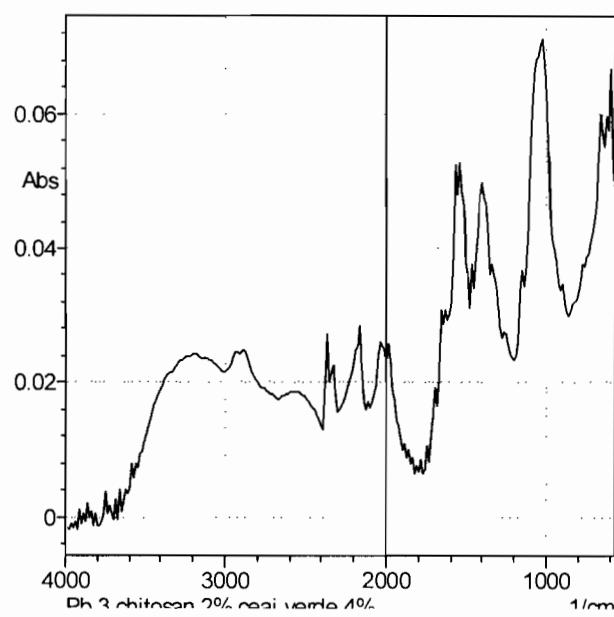
Figura 3



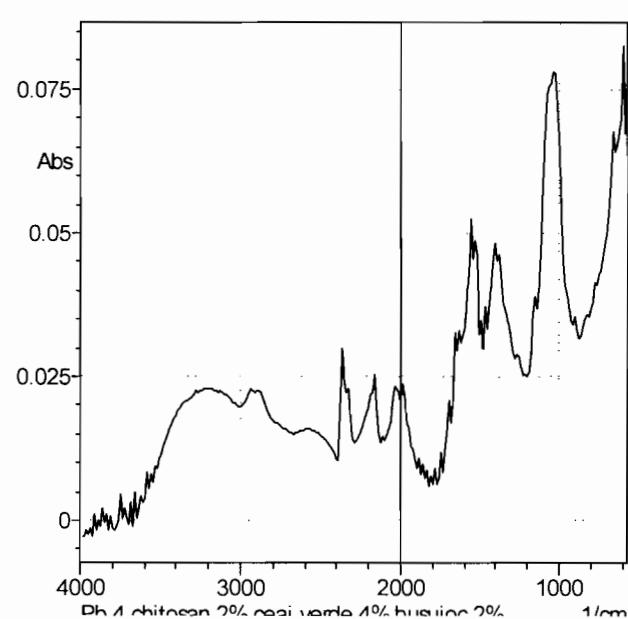
Amprenta FTIR a biofilmului prezentat în exemplul 1.



Amprenta FTIR a biofilmului prezentat în exemplul 2.



Amprenta FTIR a biofilmului prezentat în exemplul 3.



Amprenta FTIR a biofilmului prezentat în exemplul 4.

Figura 4

24

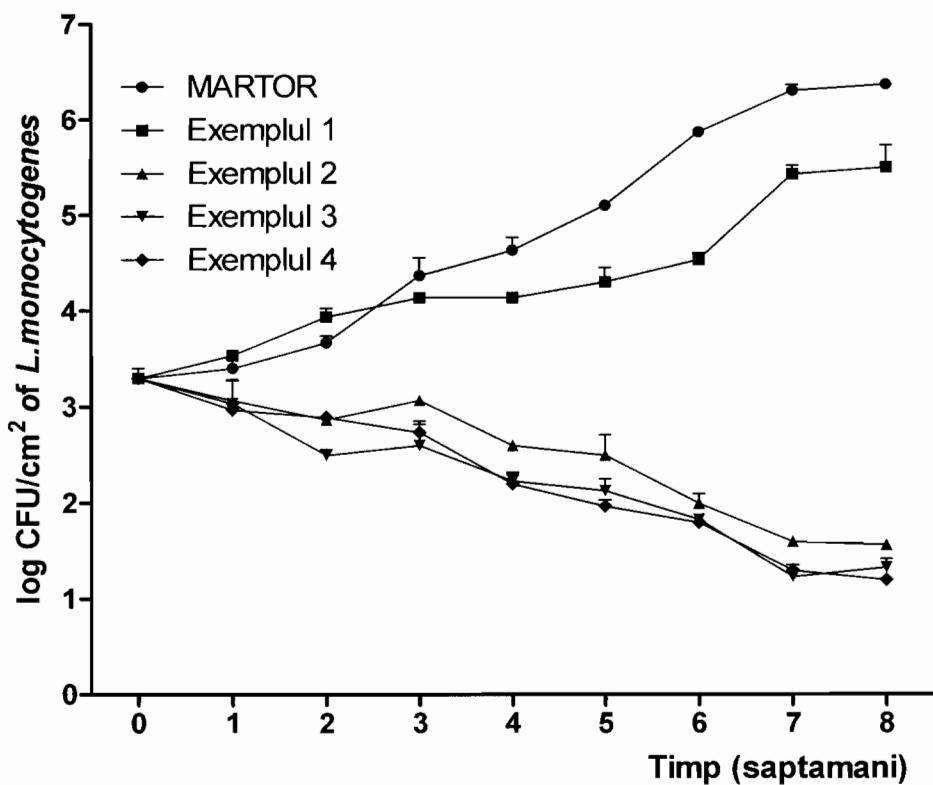


Figura 5