



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **13/04/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/06/2017** BOPI nr. **6/2017**

(41) Data publicării cererii:
29/11/2013 BOPI nr. **11/2013**

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

(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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**UBONRAT SIRIPATRAWAN, BRUCE R.
HARTE, "PHYSICAL PROPERTIES AND
ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AN ACTIVE
FILM FROM CHITOSAN INCORPORATED
WITH GREEN TEA EXTRACT", FOOD
HYDROCOLLOIDS, VOL. 24, P. 770-5,
2010; SVETLANA ZIVANOVIC, SHUANG
CHI, ANN F. DRAUGHON,
"ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF
CHITOSAN FILMS ENRICHED WITH
ESSENTIAL OILS", JOURNAL OF FOOD
SCIENCE, VOL. 70, P. M45-M51, 2005**

(54) **BIOFILM CU ACȚIUNE ANTIMICROBIANĂ, PROCEDU DE
OBȚINERE ȘI UTILIZĂRI**



RO 128966 B1

1 Invenția se referă la o gamă de ambalaje bioactive de tip film, cu activitate antimicro-
biană, destinate ambalării produselor alimentare din carne, de tipul "gata pentru consum",
3 la procedeul de obținere a acestora, și la utilizarea lor pe durata perioadei de refrigerare a
produselor.

5 În scopul inhibării dezvoltării microbiene în alimentele de tipul "gata pentru consum",
se cunoaște faptul că se adaugă substanțe cu acțiune antimicrobiană. Dezavantajul soluției
7 prezentate este dat de către substanțele antimicrobiene, care pot fi reduse sau inactivate
datorită interacțiunii compușilor antibacterieni cu compușii din alimente (**Appendini P,**
9 **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
11 **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
13 **T., Kimura B. 2011, Effect of paired antimicrobial combinations on Listeria**
monocytogenes growth inhibition in ready-to-eat seafood products. Food Control. 26,
15 **397-400).**

 Activitatea antioxidantă a filmelor formulate din chitosan și extract de ceai verde,
17 împreună cu procedeul de obținere, sunt cunoscute (**Siripatrawan U., Harte B. 2010.,**
Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan
19 **incorporated with green tea extract. Food Hydrocolloids, 24: 770-775).** Astfel, este pre-
zentat că ceaiul verde, în combinație cu chitosanul, are un efect antioxidant. Limitările soluției
21 prezentate sunt date de către imposibilitatea utilizării lor ca filme antimicrobiene, deoarece
acestea nu sunt sterile. Obținerea filmului prezentat mai sus nu are în vedere procesul de
23 sterilizare, care ar permite o solubilizare mai rapidă, și o amestecare omogenă a componen-
telor filmului.

25 Activitatea antimicrobiană a filmelor care înglobează uleiului de busuioc este
cunoscută (**Zivanovic S., Chi S., Draughon AF. 2005., Antimicrobial activity of chitosan**
27 **films enriched with essential oils. J Food Sci, 70 M45-M51).** În acest studiu, uleiul de
busuioc (pentru activitatea antimicrobiană) este adăugat ulterior procesului de sterilizare.
29 Limitările tehnice ale soluției provin din faptul că activitatea antimicrobiană este exercitată
de extractul apos de busuioc, ce conține nanoparticule de argint, care sunt ușor de legat de
31 baza chitosanică a biofilmului.

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

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

41 Un prim obiect al prezentei invenții îl reprezintă un biofilm cu acțiune antimicrobiană,
pe bază de chitosan și ceai verde, care se obține prin amestecarea unui extract apos de
43 plante, din ceai verde și busuioc, cu chitosan acidifiat cu 0,7% acid acetic glacial, amestecul
rezultat conținând 4% ceai verde, 2% busuioc și 2% chitosan, acest amestec fiind ulterior
45 sterilizat timp de 10 min la 110°C, turnat în forme, deshidratat la 37°C timp de 2 h, iar apoi
depozitat la maximum 25°C în ambalaje de plastic care să nu permită umidificarea lor.

RO 128966 B1

Un alt obiect al prezentei invenții îl reprezintă un procedeu de obținere a biofilmului cu acțiune antimicrobiană, care constă în aceea că se prepară un amestec de extract apos de plante, din ceai verde și busuioc, cu chitosan acidifiat cu 0,7% acid acetic glacial, amestecul rezultat, conținând 4% ceai verde, 2% busuioc și 2% chitosan, fiind ulterior sterilizat timp de 10 min la 110°C, turnat în forme, deshidratat la 37°C timp de 2 h, iar apoi depozitat la maximum 25°C în ambalaje de plastic care să nu permită umidificarea lor.

Un al treilea obiect al prezentei invenții este utilizarea biofilmului cu acțiune antimicrobiană, pe bază de chitosan și ceai verde, pentru ambalarea alimentelor sau ca parte constituantă a unui ambalaj.

Ambalajele bioactive de tip film se prezintă sub forma unei mase plastice care, aplicată 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, ce reprezintă alternativa ambalajelor existente, prelungind stabilitatea produsului în condiții de refrigerare, reducând incidența toxiinfecțiilor 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.

Procedeu de obținere în vederea realizării biofilmului este prezentat în fig. 1.

Plantele măcinate sunt infuzate în apă la temperatura de 100°C, timp de 15 min, iar chitosanul în concentrație de 2% este acidifiat cu acid acetic glacial 0,7%. Extractul din plante, filtrat și centrifugat, se omogenizează împreună cu chitosanul acidifiat. Amestecul obținut se sterilizează la 110°C, timp de 10 min, apoi se răcește și se toarnă în forme. Amestecul turnat în forme se deshidratează la etuvă la 37°C, timp de 4 h. După procesul de deshidratare, de pe suprafața formelor se desprinde biofilmul format. Filmul se depozitează la 25°C în ambalaje din plastic ermetic închise, 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	
Etapa I	Seleționarea și măcinarea plantelor uscate	39
Etapa II	Obținerea extractului limpede din plante, prin decantări și filtrări succesive	41
Etapa III	Obținerea amestecului de chitosan acidifiat cu acid acetic glacial	
Etapa IV	Omogenizarea extractului de plante cu chitosan acidifiat cu acid acetic glacial	43
Etapa V	Sterilizarea amestecului la 110°C, timp de 10 min	
Etapa VI	Turnarea în strat subțire a amestecului în forme	45
Etapa VII	Deshidratarea amestecului	
Etapa VIII	Depozitarea biofilmului până în momentul utilizării lui pentru ambalare	47

RO 128966 B1

1 Se dau în continuare exemple de obținere a biofilmelor.

Exemplul 1. Biofilm din chitosan 2%

3 Se prepară 100 ml de amestec umed, din care se realizează 10 discuri de biofilm de
dimensiunea 18 cm², cu greutate de 2,7 g. Se amestecă 2 g chitosan acidifiat cu 0,7 ml de
5 acid acetic glacial, și se aduce la semn (100 ml) cu apă distilată. Conform schemei din fig. 1,
amestecul se sterilizează la 110°C timp de 10 min, după care se toarnă în plăci de diametru
7 9 cm, sub formă de disc. Plăcile sunt expuse procesului de deshidratare la etuvă la 37°C,
timp de 4 h. De pe suprafața plăcilor se desprind discurile formate și se depozitează la tem-
9 peraturi mai mici de 25°C, și umiditate de maximum 40%, până în momentul utilizării sale.

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

11 Se prepară 100 ml de amestec umed, din care se realizează 10 discuri de biofilm de
dimensiunea 18 cm², cu greutate de 2,706 g. Extractul de ceai verde se obține prin infuzarea
13 a 2 g de ceai verde deshidratat în 70 ml apă la temperatura de 100°C, timp de 15 min.
Extractul se filtrează și apoi se amestecă cu 2 g chitosan acidifiat cu 0,7 ml de acid acetic
15 glacial, și se aduce la semn (100 ml) cu apă distilată. Conform schemei din fig. 1, amestecul
se sterilizează la 110°C timp de 10 min, după care se toarnă în plăci de diametru 9 cm, sub
17 formă de disc. Plăcile sunt expuse procesului de deshidratare la etuvă la 37°C, timp de 4 h.
De pe suprafața plăcilor se desprind discurile formate și se depozitează la temperaturi mai
19 mici de 25°C, și umiditate de maximum 40%, până în momentul utilizării acestora.

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

21 Se prepară 100 ml de amestec umed, din care se realizează 10 discuri de biofilm de
dimensiunea 18 cm², cu greutate de 2,712 g. Extractul de ceai verde se obține prin infuzarea
23 a 4 g de ceai verde deshidratat în 70 ml la temperatura de 100°C, timp de 15 min. Extractul
se filtrează și apoi se amestecă cu 2 g chitosan acidifiat cu 0,7 ml de acid acetic glacial, și
25 se aduce la semn (100 ml) cu apă distilată. Conform schemei din fig. 1, amestecul se sterili-
zează la 110°C timp de 10 min, după care se toarnă în plăci de diametru 9 cm, sub formă
27 de disc. Plăcile sunt expuse procesului de deshidratare la etuvă la 37°C, timp de 4 h. De pe
suprafața plăcilor se desprind discurile formate și se depozitează la temperaturi mai mici de
29 25°C și umiditate de maximum 40%, până în momentul utilizării acestora.

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

31 Se prepară 100 ml de amestec umed, din care se realizează 10 discuri de biofilm de
dimensiunea 18 cm², cu greutate de 2,88 g. Extractul de ceai verde și busuioc se obține prin
33 infuzarea a 4 g de ceai verde deshidratat și a 2 g de busuioc deshidratat în 70 ml apă la tem-
peratura de 100°C, timp de 15 min. Extractul se filtrează și apoi se amestecă cu 2 g pudră
35 de chitosan acidifiat cu 0,7 ml de acid acetic glacial, și se aduce la semn (100 ml) cu apă dis-
tilată. Conform schemei din fig. 1, amestecul se sterilizează la 110°C, timp de 10 min, după
37 care se toarnă în plăci de diametru 19 mm, sub formă de disc. Plăcile sunt expuse proce-
sului de deshidratare la etuvă la 37°C, timp de 4 h. De pe suprafața plăcilor se desprind
39 discurile formate și se depozitează la temperaturi mai mici de 25°C, și umiditate de maximum
40%, până în momentul utilizării acestora.

41 Se menționează în continuare explicația fig. 1...5.

- fig. 1, schema tehnologică de obținere a biofilmului;

43 - fig. 2, amprente spectrofotometrice specifice extractelor din plante utilizate în reali-
zarea biofilmelor din exemplele 2...4;

45 - fig. 3, amprente cromatografice specifice extractelor din plante utilizate în realizarea
biofilmelor din exemplele 2...4;

47 - fig. 4, amprente FTIR specifice biofilmelor prezentate în exemplele 1...4;

49 - fig. 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 ($\lambda = 280 \text{ nm}$) prezentate în fig. 2.

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

Compușii fenolici identificați în extractele utilizate la realizarea biofilmelor din exemplele 2...4 sunt prezentați în tabelul următor.

Tabelul 2

Nr. semnal	Denumire compus fenolic	Timp de retenție (t_R)	Conținut mg%		
			Exemplul 2	Exemplul 3	Exemplul 4
1.	Galocatechina	5,76	1,8	3,2	3,4
2.	Catechina	11,150	4,4	8,2	9,02
3.	Epigalocatechina	12,12	4,3	8,6	8,89
4.	Galocatechingalat	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 prezentate în exemplele 1...4, următoarele benzi specifice pentru grupările O-H: $2800...2900 \text{ cm}^{-1}$; prezența polizaharidelor se identifică prin benzile de la $1155...1032 \text{ cm}^{-1}$. O altă bandă de absorbție s-a identificat la 1598 cm^{-1} , caracteristică prezenței grupării amino ($-\text{NH}_2$). Benzile de la 1654 cm^{-1} și 1317 cm^{-1} sunt caracteristice amidei I și amidei II, specifice nediacetilării în întregime a chitosanului.

Capacitatea antimicrobiană a biofilmelor

Studii experimentale

În vederea demonstrării capacității antimicrobiene a biofilmelor prezentate anterior, s-au realizat studii experimentale în triplicat pentru fiecare tip de biofilm prezentat în exemplele 1...4. Capacitatea antimicrobiană exercitată de biofilme a fost determinată pe produsul de tip "gata de consum", și anume, pe friptura din pulpă de porc ambalată sub vid, timp de 8 săptămâni. Inițial, bucăți de friptură de 12 cm^2 au fost inoculate cu $3 \cdot 10^3 \text{ CFU/cm}^2$ de *L. monocytogenes*. Probele au fost ambalate în biofilme, iar apoi supuse ambalării în nailon/polietilenă cu ajutorul aparatului de ambalare în condiții de vacuum. 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 fig. 5, proba Martor (ambalare fără biofilm) în 8 săptămâni de la inoculare ajunge să-și dubleze încărcătura microbiană. În cazul biofilmului prezentat în exemplul 1 (ambalare cu biofilm de chitosan), eficiența este mai mare în primele 6 săptămâni, urmând ca în săptămânile 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 inhibitori microbieni, se prezintă cea mai bună acțiune antilisterică, ducând la înjumătățirea încărcăturii inițiale.

RO 128966 B1

- 1 Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:
- reducerea microbiană din produsele din carne de tip “gata pentru consum”;
- 3
- evitarea utilizării substanțelor de sinteză chimică drept aditivi antimicrobieni;
 - biodegradabilitatea ambalajelor;
- 5
- acțiunea antimicrobiană la suprafața produselor;
 - incidența de toxiinfecții alimentare.

RO 128966 B1

Revendicări

- | | |
|---|---------------|
| | 1 |
| 1. Biofilm cu acțiune antimicrobiană, pe bază de chitosan și ceai verde, caracterizat prin aceea că se obține prin amestecarea unui extract apos de plante, din ceai verde și busuioc, cu chitosan acidifiat cu 0,7% acid acetic glacial, amestecul rezultat conținând 4% ceai verde, 2% busuioc și 2% chitosan, fiind ulterior sterilizat timp de 10 min la 110°C, turnat în forme, deshidratat la 37°C, timp de 2 h, iar apoi depozitat la maximum 25°C, în ambalaje de plastic care să nu permită umidificarea acestora. | 3
5
7 |
| 2. Procedeu de obținere a biofilmului cu acțiune antimicrobiană, pe bază de chitosan și ceai verde, caracterizat prin aceea că se prepară un amestec de extract apos de plante, din ceai verde și busuioc, cu chitosan acidifiat cu 0,7% acid acetic glacial, amestecul rezultat conținând 4% ceai verde, 2% busuioc și 2% chitosan, fiind ulterior sterilizat timp de 10 min la 110°C, turnat în forme, deshidratat la 37°C, timp de 2 h, iar apoi depozitat la maximum 25°C în ambalaje de plastic care să nu permită umidificarea acestora. | 9
11
13 |
| 3. Utilizarea biofilmului definit în revendicarea 1, pentru ambalarea alimentelor sau ca parte constituantă a unui ambalaj. | 15 |

(51) Int.Cl.

C08L 5/08 (2006.01);

C08J 5/18 (2006.01);

A23B 4/00 (2006.01)

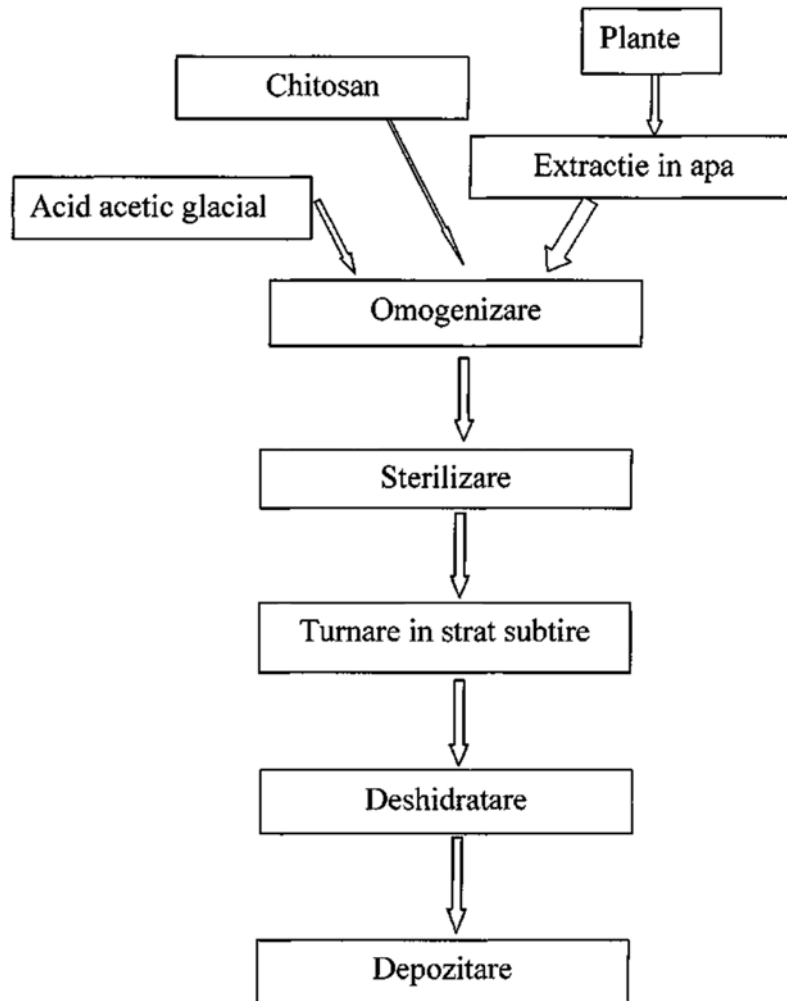


Fig. 1

(51) Int.Cl.

C08L 5/08 (2006.01);

C08J 5/18 (2006.01);

A23B 4/00 (2006.01)

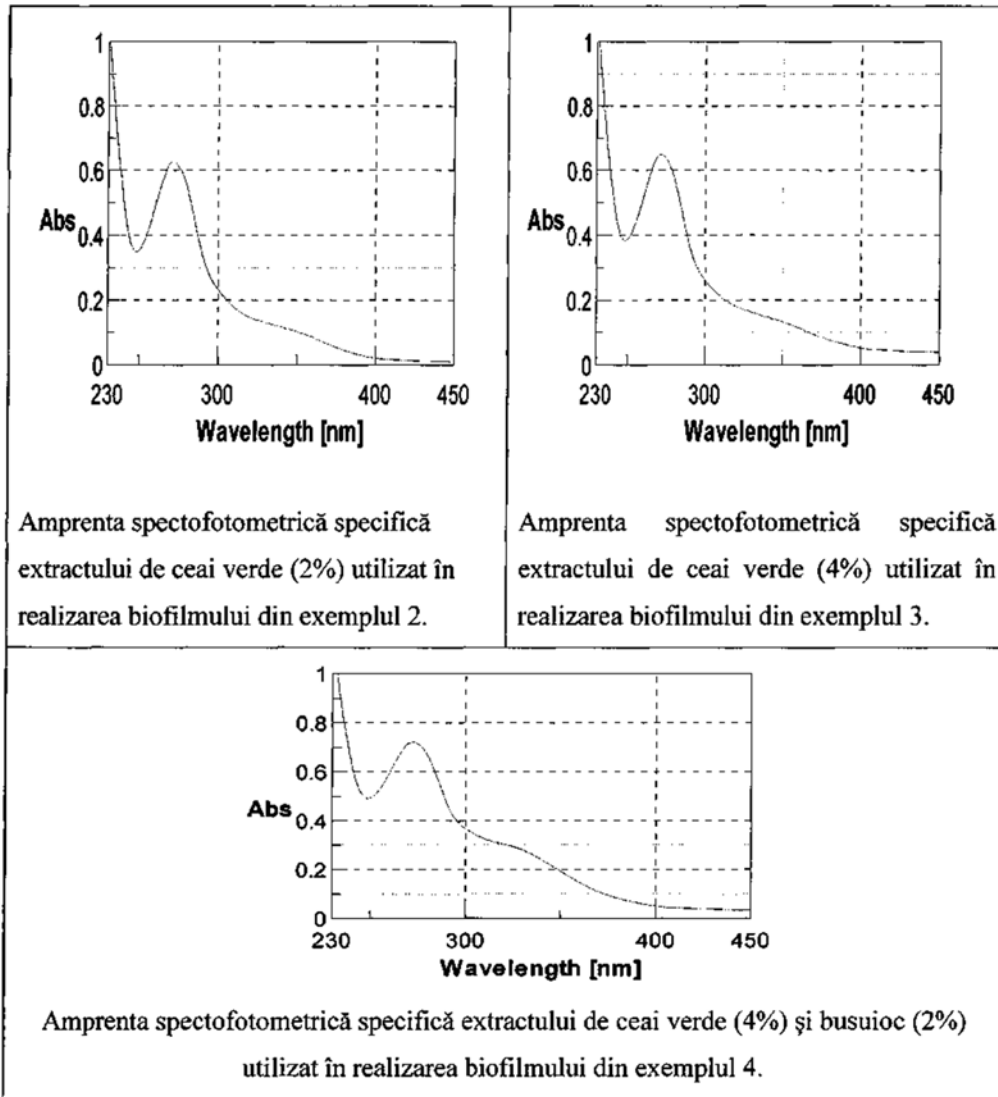


Fig. 2

(51) Int.Cl.

C08L 5/08 (2006.01);

C08J 5/18 (2006.01);

A23B 4/00 (2006.01)

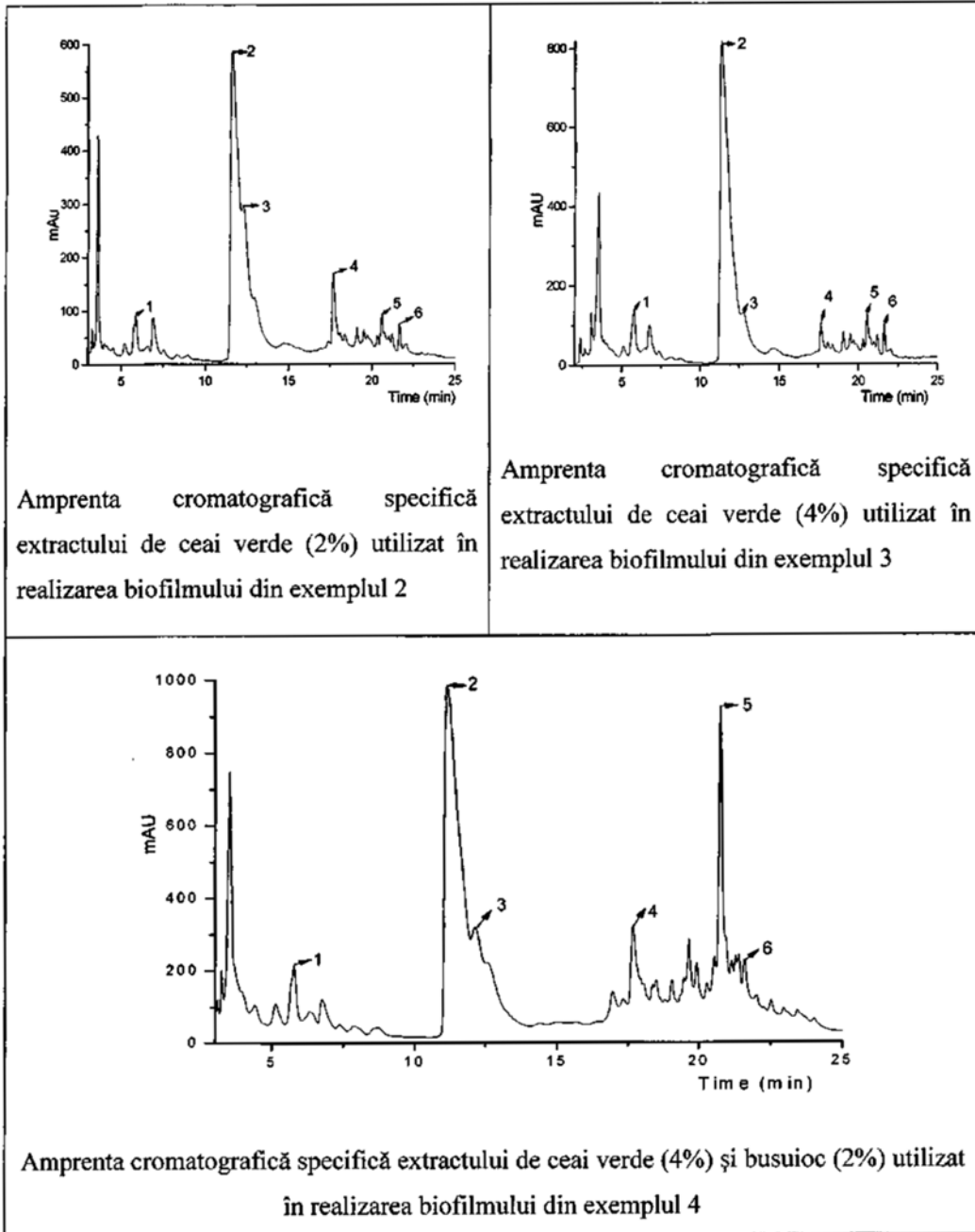


Fig. 3

(51) Int.Cl.

C08L 5/08 (2006.01);

C08J 5/18 (2006.01);

A23B 4/00 (2006.01)

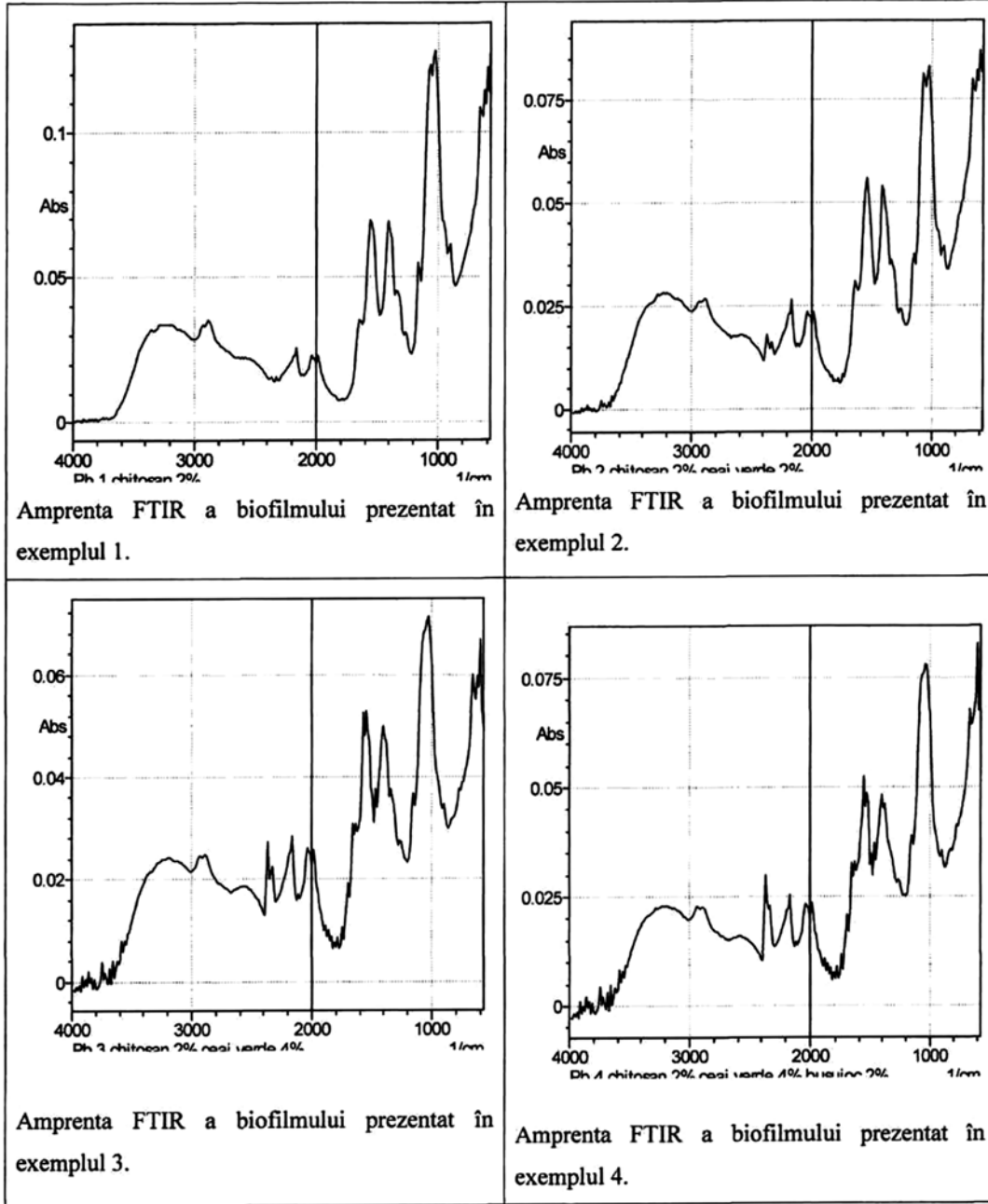


Fig. 4

(51) Int.Cl.

C08L 5/08 (2006.01);

C08J 5/18 (2006.01);

A23B 4/00 (2006.01)

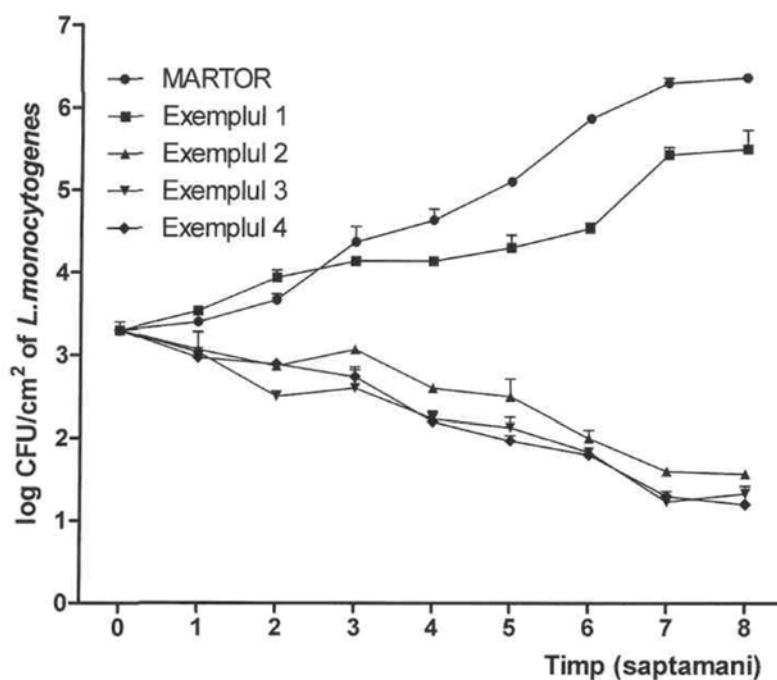


Fig. 5



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 284/2017