



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 01104**

(22) Data de depozit: **13/12/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2020 BOPI nr. **3/2020**

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

(72) Inventatori:
• DIMA CRISTIAN VASILE,
STRADA TECUCI, NR.225, BL.PM 4, AP.12,
GALAȚI, GL, RO;
• STOICA MARICICA, STRADA ROȘIORI,
NR.6, BL.R5, AP 67, GALAȚI, GL, RO;
• ALEXE PETRU, STR.DOMNEASCĂ
NR.77, BL.E, AP.13, GALAȚI, GL, RO

(54) **OBȚINEREA UNUI COLORANT NATURAL LICHID, PE BAZĂ
DE NITROZOHMOGLOBINĂ (II)**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui colorant natural lichid, pe bază de nitrozohemoglobină, pentru preparate din carne. Procedeu conform invenției constă în reacția de nitrozare controlată, realizată la maximum 1 h după recoltarea sângelui, a hemoglobinei din 1000 ml sânge, stabilizat, cu 15 g acid ascorbic și cu 3 g nitrit de sodiu, la temperatura de 34...36°C, pH

de 5,9...6, sub agitare energetică, timp de 15 min, rezultând cu un randament de peste 80% nitrozohemoglobină ce poate fi utilizată drept colorant pentru înlocuirea nitritului în produsele de carne.

Revendicări: 4



Descrierea invenției

Obiectul prezentei invenții îl constituie **obținerea unui colorant natural lichid, pe bază de nitrozohemoglobină (NOHb)** printr-o reacție de nitrozare controlată a hemoglobinei din sânge (recoltat pe EDTA - acid etilendiaminetetraacetic - ca anticoagulant), cu acid ascorbic și nitrit de sodiu **și utilizarea acestuia pentru obținerea bradt-ului**, în vederea producerii de preparate din carne cu un conținut ultraredus de nitrit și cu culoare similară cu preparatele clasice.

Culoarea reprezintă prima impresie majoră ce influențează semnificativ selecția produselor din carne și decizia de cumpărare a acestora [Carpenter și al., 2001; Bredahl, 2004; Krystallis și Chrysohoidis, 2005; Stoica și Alexe, 2016; Xu și al., 2016]. Pentru obținerea produselor din carne se utilizează nitritul de sodiu în procesele de sărare, pentru efectele sale complexe (formarea culorii roz-roșu, a aromei, activitate antioxidantă și antimicrobiană) [Xu și al., 2016; Stoica și al., 2018; Liu și al., 2019]. În procesul de formare a culorii, oxidul nitric, produs de degradare a nitritului de sodiu, reacționează cu mioglobina și hemoglobina formând nitrozopigmenți, și anume: nitrozomioglobina și nitrozohemoglobina, ce acționează ca pigmenți de sărare. Formarea nitrozomioglobinei și nitrozohemoglobinei este posibilă datorită unor procese chimice complexe: denaturarea globinei, partea proteică a pigmentilor și reducerea nitritului sub acțiunea enzimelor proprii țesutului muscular, a bacteriilor reducătoare sau a substanțelor reducătoare. Cu toate acestea, pe lângă formarea culorii și a celorlalte efecte benefice, nitritul de sodiu stă la baza formării nitrozaminelor, considerate a fi compuși cancerigeni [Gangolli și al., 1994; Sanchez-Echaniz și al., 2001; Sindelar și Milkowski, 2011; Sultana și al., 2014; Stoica și al., 2018]. Prin urmare, există un interes considerabil, la nivel mondial de reducere a nivelului de nitrit rezidual și de dezvoltare a unor coloranți din surse naturale. Sângele, subprodus de abator, bogat în proteine și în alți nutrienți, reprezintă cel mai important colorant natural, fiind o bună alternativă la culoarea generată de nitrit. Cu toate acestea, nu este stabil și oferă o culoare întunecată produselor din carne în care este adăugat. De aceea, este necesară dezvoltarea unor strategii de stabilizare a hemoglobinei (pigmentul roșu din sânge). Una dintre aceste strategii este convertirea hemoglobinei, din sângele provenit de la animale, în nitrozohemoglobină, utilizând acid ascorbic și nitrit de sodiu, încercându-se saturarea în acest nitrozomioglobină.

Invenția se individualizează prin reacția de nitrozare controlată (realizată la maximum o oră de la recoltarea sângelui) a hemoglobinei din sânge cu acid ascorbic și nitrit de sodiu cu un randament de nitrozare de peste 80%. Pentru menținerea sângelui în stare fluidă și pentru conservarea optimă a componentelor celulare, sângele a fost recoltat pe EDTA [Lam și al., 2004; Banfi și al., 2007].

Parametrii invenției

Sinteza nitrozohemoglobinei (NOHb). NOHb a fost obținută printr-o reacție de nitrozare controlată, realizată la maximum o oră de la recoltarea sângelui, a hemoglobinei din 1000 ml sânge (34-36 °C, pH 7,1 - 7,3, stabilizat cu 1 g EDTA) cu 15 g acid ascorbic (34-36 °C, reglând pH-ul între 5,7 și 6 – intervalul optim pentru obținerea de NO capabil să reacționeze cu Hb, agitare energetică 15 minute) și cu 3 g nitrit de sodiu (34-36 °C, pH 5,90 - 6, agitare energetică 15 minute). NOHb stabilă, obținută cu un randament de nitrozare de peste 80%, a fost păstrată în condiții de refrigerare și utilizată a doua zi la prepararea a patru variante de bradt.

Prepararea bradt-ului cu nitrozohemoglobină (NOHb). Pentru evaluarea culorii și pentru determinarea analitică a nitritului rezidual s-au obținut patru variante de bradt cu NOHb (variantele P2, P3, P4 și P5, la care NOHb a fost adăugată în proporție de 2 ml la 1000 g carne; varianta P3, la care NOHb a fost adăugată în proporție de 3 ml la 1000 g carne; varianta P5, la care NOHb a fost adăugată în proporție de 5 ml la 1000 g carne și



variante P7, la care NOHb a fost adăugată în proporție de 7 ml la 1000 g carne) și o probă martor (M) realizată clasic cu nitrit convențional adăugat în proporție de 15 mg la 1000 g carne. Cele patru variante (P2, P3, P5 și P7) cât și proba martor (M) au fost realizate în stația pilot de prelucrare carne din 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, respectând operațiile tehnologice ale procesului clasic de obținere a bradț-ului. NOHb a fost adăugată la etapa de cuterizare.

Experimente efectuate

- Evaluarea conținutului de nitrit rezidual în sângele nitrozat [STAS 11581-83];
- Evaluarea vizuală a culorii pentru cele patru variante (P2, P3, P5 și P7) și pentru proba martor (M);
- Evaluarea culorii prin determinarea parametrilor L^* , a^* și b^* pentru cele patru variante (P2, P3, P5 și P7) și proba martor (M) (Tabelul 1);
- Evaluarea conținutului de nitrit rezidual pentru cele patru variante (P2, P3, P5 și P7) (Tabelul 2).

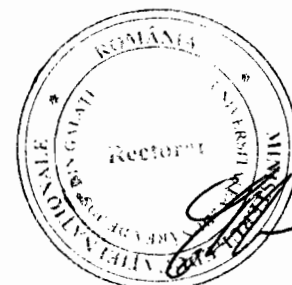
Evaluarea conținutului de nitrit rezidual în sângele nitrozat (NOHb). Nivelul de nitrit rezidual în NOHb a fost de 37,43 mg %, și semnifică un randament de nitrozare de peste 80%.

Evaluarea vizuală a culorii pentru cele patru variante (P2, P3, P5 și P7) și pentru proba martor (M). Culoarea produselor din carne este un atribut senzorial important, fiind caracteristica determinantă în acceptabilitatea produselor din carne de către consumator. Culoarea pentru cele patru variante de bradț obținute cu nitrozohemoglobină (P2, P3, P5 și P7) și pentru proba martor (M) a fost analizată vizual. S-a observat că intensitatea culorii roz-roșu este proporțională cu cantitatea de nitrozohemoglobină adăugată; varianta P7 fiind varianta cu culoarea cea mai roșie. Variantele P2, P3, P5 și P7 au o culoare fezabilă și pot satisface consumatorii în funcție de preferințele acestora în ceea ce privește culoarea preparatelor din carne.

Evaluarea culorii prin determinarea parametrilor L^ , a^* și b^* pentru cele patru variante (P2, P3, P5 și P7) și pentru proba martor (M).* Parametrii de culoare L^* , a^* și b^* au fost determinați cu ajutorul colorimetrului portabil Chroma Meter model CR-400 (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japan, 2015). Colorimetrul utilizează parametrul L^* - componenta de luminozitate cu un interval de la 0 (negru) până la 100 (alb), a^* - componenta verde-roșu, cu un interval de la -120 (verde) până la +120 (roșu) și b^* componenta galben-albastru, cu un interval de la -120 (albastru) până la +120 (galben) [Chen și al., 2010]. Pentru proba martor (M) și pentru fiecare variantă (P2, P3, P5 și P7) s-au efectuat câte șase măsurători pe felii cu grosimea de 1 cm [Xu și al., 2016]. Valorile înregistrate pentru parametrul L^* , a^* și b^* sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1. Valorile parametrilor de culoare L^* , a^* și b^*

Proba control / Varianta	L^*	a^*	b^*
M	65,69	13,21	8,33
P2	63,98	9,20	9,51
P3	63,09	9,29	9,59
P5	61,15	10,08	9,47
P7	59,51	12,17	9,08



Parametrii L^* , a^* și b^* au o contribuție importantă la impresia totală a culorii. Din Tabelul 1 se observă că în cazul celor patru variante P2, P3, P5 și P7, luminozitatea (parametrul L^*) și strălucirea (parametrul b^*) scad o dată cu creșterea cantității de nitrozopigment adăugate, în timp ce componenta roșie (parametrul a^*) crește proporțional. Comparativ cu proba martor - cea cu nitrit convențional (M), variantele P2, P3, P5 și P7 - cele cu nitrozohemoglobină - au prezentat valori mai mici pentru parametrii L^* și a^* . În ceea ce privește componenta cromatică a^* , varianta P7 a prezentat valoarea cea mai apropiată de valoarea probei martor, respectiv 92% din culoarea dată de proba martor (M).

Evaluarea conținutului de nitrit rezidual pentru cele patru variante (P2, P3, P5 și P7). Nivelurile de nitrit rezidual pentru variantele P2, P3, P5 și P7 sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 2. Conținutul de nitrit rezidual pentru variantele P3 și P7

Varianta	Nitrit rezidual (mg%)
P2	0,10
P3	0,16
P5	0,20
P7	0,25

Din Tabelul 2 se observă că în cele patru variante P2, P3, P5 și P7, s-a redus nitritul rezidual de la limita maximă acceptată, de 7 mg%, la un conținut de 0,10 mg% (P2), 0,16 mg% (P3), 0,20 mg% (P5) și de 0,25 mg% (P7).

Concluzii

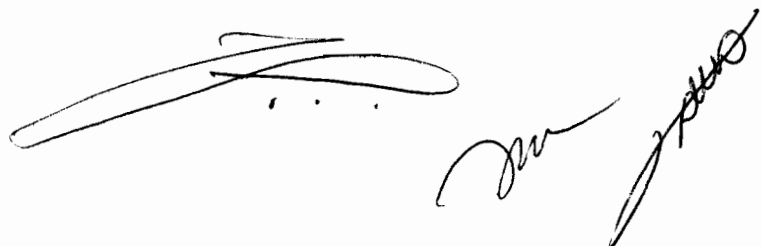
Nitrozohemoglobina (NOHb) obținută printr-o reacție de nitrozare controlată a hemoglobinei din sânge (recoltat pe EDTA) cu acid ascorbic și nitrit de sodiu reprezintă o alternativă viabilă la nitrozomioglobina generată de către nitritul convențional. Rezultatele au arătat că NOHb, astfel obținută, a produs o culoare roz-roșu, similară (92% din culoarea dată de proba martor) culorii produse de către nitritul convențional și ultrareducerea nitritului rezidual (96 - 98 % din valoarea maximă admisă) și poate fi utilizată drept colorant pentru înlocuirea nitritului în produsele din carne.

Bibliografie

1. Banfi G., Salvagno GL., Lippi G. 2007. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45(5), 565-576.
2. Bredahl L. 2004. Cue utilisation and quality perception with regard to branded beef. *Food Qual Pref*, 15, 65-75.
3. Carpenter CE., Cornforth DP., Whittier D. 2001. Consumer preferences for beef color and packaging did not affect eating satisfaction. *Meat Science*, 57, 359-363.
4. Chen Z., Zhu C., Zhang Y., Niu D., Du J. 2010. Effects of aqueous chlorine dioxide treatment on enzymatic browning and shelf-life of fresh-cut asparagus lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 58, 232-238.



5. Gangolli SD., van den Brandt PA., Feron VJ., Janzowsky C., Koeman JH., Speijers GJA., Spiegelhalder B, Walker R, Wisnok JS. 1994. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *European Journal of Pharmacology Environmental Toxicology and Pharmacology Section*, 292, 1-38.
6. Krystallis A, Chrysosoidis G. 2005. Consumers' willingness to pay for organic food: Factors that affect it and variation per organic product type. *British Food Journal*, 107, 320-343.
7. Lam NYL., Rainer TH., Chiu RWK., Dennis Lo YM. 2004. EDTA Is a Better Anticoagulant than Heparin or Citrate for Delayed Blood Processing for Plasma DNA Analysis. DOI: 10.1373/clinchem.2003.026013.
8. Liu P., Wang S., Zhang H., Wang H., Kong B. 2019. Influence of glycated nitrosohaemoglobin prepared from porcine blood cell on physicochemical properties, microbial growth and flavour formation of Harbin dry sausages. *Meat Science*, 148, 96-104.
9. Sanchez-Echaniz J., Benito-Fernandez J., Mintegui-Raso S. 2001. Methemoglobinemia and consumption of vegetables in infants. *Pediatrics*, 107(5), 1024-1028.
10. Sindelar JJ., Milkowski AL. 2011. Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: A review of curing and examining the risk/benefit of its use. *AMSA white paper series. Illinois, USA: American Meat Science Association*, 3, 1-14.
11. Stoica M., Alexe P. 2016. *Elemente de proiectare a produselor alimentare noi*. Ed. Academica, Galați, ISBN 978-973-8937-98-7, 278 p.
12. Stoica M., Mihalcea M., Dima C., Alexe P. Produs din carne cu cătină, la Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor din Galați. *Industria cărnii*, www.industriacarnii.ro, martie – aprilie 2018, 76-79.
13. Sultana T., Rana J., Chakraborty SR., Das KK., Rahman T., Noor R. 2014. Microbiological analysis of common preservatives used in food items and demonstration of their in vitro anti-bacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Diseases*, 4, 452-456.
14. STAS 11581-83.
15. Xu P., Zhu X., Tan S., Qin H., Zhou C. 2016. The Role of Monoxide Hemoglobin in Color Improvement of Chicken Sausage. *Food Science and Biotechnology*, 25(2), 409-414.
16. <https://www.foodnavigator.com/Article/2018/02/01/Superfruit-sea-buckthorn-is-top-natural-preservative-for-clean-labels-says-Superfruiticals>.



Revendicări

Invenția cuprinde 4 revendicări:

1. **Procedeul de obținere a nitrozohemoglobinei**
2. **Reducerea nitritului rezidual cu 96 - 98% din valoarea maximă admisă**
3. **Utilizarea nitrozohemoglobinei (NOHb) la obținerea bradt-ului**
4. **Utilizarea bradt-ului obținut cu nitrozohemoglobină la preparatele comune din carne cu structură omogenă și eterogenă**

Revendicare independentă.

Nitrozohemoglobina (NOHb), destinată obținerii preparatelor din carne, **caracterizată prin aceea că** este obținută prin nitrozarea controlată a hemoglobinei din una parte sânge (stabilizat cu 0,01 părți EDTA) cu 0,015 părți acid ascorbic și cu 0,003 părți nitrit de sodiu, părțile fiind exprimate în greutate, în vederea obținerii unei nitrozohemoglobine stabile cu un randament de nitrozare de peste 80%, se prezintă ca o mixtură lichidă, fină, omogenă, de culoare roșu închis, oferă preparatelor din carne **culoare roz-roșu, specifică preparatelor din carne**, contribuie la **reducerea nivelului de nitrit rezidual** în preparatele din carne în proporție de 96 - 98%.

Revendicările dependente.

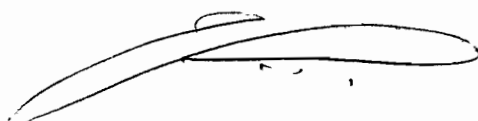
Revendicarea 1.

Procedeul de obținere a nitrozohemoglobinei este caracterizat prin aceea că hemoglobina din una parte sânge (34-36 °C, pH 7,1 - 7,3 stabilizat cu 0,01 părți EDTA) este controlat nitrozată cu 0,015 părți acid ascorbic (34-36 °C, reglând pH-ul între 5,7 și 6 – intervalul optim pentru obținerea de NO capabil să reacționeze cu Hb, agitare energetică 15 minute) și cu 0,003 părți nitrit de sodiu (34-36 °C, pH 5,90 – 6, agitare energetică 15 minute), părțile fiind exprimate în greutate, în vederea obținerii unei nitrozohemoglobine (NOHb) stabile cu un randament de nitrozare de peste 80%.

Revendicarea 2.

Reducerea nitritului rezidual cu 96 - 98%, din valoarea maximă admisă, prin înlocuirea nitritului convențional cu un colorant natural pe bază de NOHb reprezintă o strategie de diminuare a expunerii consumatorilor la doze mari de nitrit și o soluție tehnologică viabilă, culoarea roz-roșu a preparatelor din carne obținute cu acest colorant fiind similară preparatelor din carne obținute cu nitrit convențional.

Revendicarea 3.



Utilizarea nitrozohemoglobinei (NOHb) la obținerea bradt-ului. Bradt-ul cu nitrozohemoglobină, caracterizat prin aceea că este constituit din 100 părți carne, **0,2 părți sau 0,3 părți sau 0,5 părți sau 0,7 părți nitrozohemoglobină**, 20 părți apă tehnologică, 10 părți fulgi de gheață raportat la carnea cuterizată, 2 părți sare, 0,2 părți piper măcinat, 0,3 părți usturoi, 0,15 părți coriandru măcinat, 0,3 părți polifosfat, părțile fiind exprimate în greutate și se prezintă ca un produs cu structură fină, omogenă, fără aglomerări, elastică, de culoare roz până la roșu în funcție de cantitatea de nitrozohemoglobină adăugată respectiv 0,2 părți, 0,3 părți, 0,5 părți, 0,7 părți, **cu o detectare de nitrit rezidual de la 0,10 mg% la 0,25 mg%.**

Revendicarea 4.

Utilizarea bradt-ului obținut cu nitrozohemoglobină (NOHb) la preparatele din carne cu structură omogenă și eterogenă. Conform tehnologiei generale de obținere a preparatelor comune din carne cu structură omogenă și eterogenă, compoziția este formată din **bradt sau bradt și șrot**, bradt-ul fiind pasta de legătură cu caracteristici de adezivitate și vâscozitate ce asigură consistența, elasticitatea și succulența specifică preparatelor comune din carne cu structură omogenă și eterogenă, **bradt-ul cu nitrozohemoglobină (NOHb)**, caracterizat prin aceea că s-a obținut prin mărunțire la volf prin sita cu ochiuri de 3 mm, cuterizare 10 minute la două trepte de viteză 1500 rpm și 3000 rpm cu adaosul fulgilor de gheață, amestecului de condimente și a colorantului pe bază de nitrozohemoglobină și mărunțire ultrafină printr-o trecere în moara coloidală, poate fi utilizat la orice tip de preparat din carne cu structură omogenă și eterogenă.

