



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 01105

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

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI COLORANT SUB FORMĂ  
DE PULBERE, PE BAZĂ DE CARBOXIHEMOGLOBINĂ  
(COHb), PENTRU UTILIZAREA LA OBTINEREA  
PREPARATELOR COMUNE DIN CARNE**

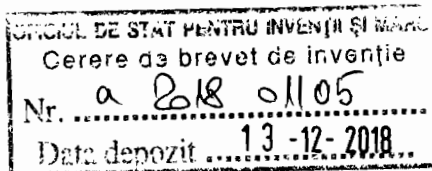
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui colorant pe bază de carboxihemoglobină, pentru preparate comune din carne. Procedeu conform invenției constă în complexarea controlată cu monoxid de carbon a hemoglobinei dintr-un concentrat eritrocitar, adus la concentrația din sânge prin înlocuirea plasmei cu soluție

izotonică de clorură de sodiu, și liofilizarea amestecului obținut, rezultând un colorant sub formă de pudră fină, de culoare roșu strălucitor.

Revendicări: 4





### Descrierea invenției

Obiectul prezentei invenții îl constituie realizarea unui **procedeu de obținere a unui colorant sub formă de pulbere, pe bază de carboxihemoglobină (COHb), pentru utilizarea la obținerea preparatelor comune din carne**. Procedeu se referă la obținerea colorantului (pulberea de carboxihemoglobină), prin complexarea cu monoxid de carbon (CO) a Hb dintr-un concentrat eritrocitar, după separarea plasmei din sânge și reconstituirea concentrației inițiale de eritrocite prin adăugarea de soluție de clorură de sodiu izotonă. Concentratul a fost obținut prin centrifugare din sânge de origine animală, recoltat aseptice pe EDTA - acid etilendiaminotetracetic - ca anticoagulant. Soluția astfel obținută a fost uscată prin liofilizare. Pulberea poate fi utilizată la obținerea bradț-ului, în vederea producerii de preparate din carne cu nivel zero de NaNO<sub>2</sub> (nitrit de sodiu) și cu o culoare similară preparatelor clasice obținute cu NaNO<sub>2</sub> convențional.

Culoarea reprezintă un indicator al calității produsului, ce influențează semnificativ selecția produselor din carne de către consumator [Carpenter și al., 2001; Bredahl, 2004; Krystallis și Chryssohoidis, 2005; Stoica și Alexe, 2016; Xu și al., 2016]. Pentru obținerea preparatelor din carne se utilizează NaNO<sub>2</sub>, aditiv, multifuncțional, pentru efectele sale complexe (formarea culorii roz-roșu, a aromei, activitate antioxidantă și activitate 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 NaNO<sub>2</sub>, reacționează cu pigmentii mioglobina (Mb) și hemoglobina (Hb) formând nitrozomioglobina (NOMb) și nitrozohemoglobina (NOHb). Formarea NOMb și NOHb 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, NaNO<sub>2</sub> 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 global de reducere a nivelului de NaNO<sub>2</sub> rezidual și de dezvoltare / perfecționare a unor coloranți din surse naturale. Sângele, subprodus de abator (ieftin), bogat în proteine și în alți nutrienți, reprezintă cel mai important colorant natural, fiind o bună alternativă la culoarea generată de NaNO<sub>2</sub>. Totuși, utilizarea integrală a sângelui este mai puțin sigură din punct de vedere microbiologic. Separarea sângelui, prin centrifugare, în părțile sale componente - concentrat eritrocitar și plasmă - îndepărtarea plasmei și utilizarea doar a concentratului eritrocitar reduce pericolul microbiologic. În plus, odată cu îndepărtarea plasmei sunt îndepărtate și proteinele plasmatice (aproximativ 100 de proteine) care, denaturate fiind sub influența căldurii (tratamentul termic), contribuie la culoarea întunecată (indezirabilă) a produselor din carne. Pe de altă parte, hemoglobina (Hb) - pigmentul roșu și component major al concentratului eritrocitar - este instabilă, fiind denaturată / convertită în urma tratamentului termic în methemoglobină (MetHb), pigment care dă o culoare maro întunecată (de asemenea, nedorită) produselor din carne, mai ales la adaosuri mari de concentrat eritrocitar (sânge) în pastă. Din aceste motive, este necesară perfecționarea unor strategii de stabilizare a Hb (din concentrat eritrocitar obținut din sângele provenit de la animale) cu monoxid de carbon (CO) cu formare de carboxihemoglobină (COHb), compus cu o mare stabilitate chimice și cu o mare putere de colorare.

Invenția se individualizează prin complexarea, controlată, cu monoxid de carbon (CO) a hemoglobinei (Hb) dintr-un concentrat eritrocitar adus la concentrația din sânge prin înlocuirea plasmei cu soluție izotonă de clorură de sodiu și liofilizarea amestecului nitrozat cu obținerea colorantului pulbere și prin utilizarea acestuia la obținerea preparatelor din carne.



### **Parametrii invenției**

*Sinteza carboxihemoglobinei (COHb) stabile.* COHb a fost obținută prin barbotarea controlată a 4 litri CO (0,5 litri / minut, 8 minute) în 400 g concentrat eritrocitar obținut în urma centrifugării (5000 rpm, 20°C, 10 minute) a 1000 g sânge (aseptic prelevat și menținut în stare fluidă cu 1 g EDTA), adus la concentrația din sânge cu 600 g soluție izotonă de NaCl (0,85%) cu agitarea concentratului reconstituit, pentru a permite CO să reacționeze cu Hb. COHb, astfel obținută, a fost supusă unui proces de liofilizare și păstrată în condiții corespunzătoare, în recipiente de culoare închisă, la temperatura camerei. După solubilizarea pulberii liofilizate, s-a procedat la formarea unei soluții stoc la nivelul concentrației eritrocitare din sânge și s-a procedat la adăugarea soluției stoc în proporții diferite pentru a obține un optim de culoare în produsul din carne.

*Prepararea bradt-ului cu pudră pe bază de carboxihemoglobină (COHb) liofilizată.* Pentru stabilirea proporției optime de pudră pe bază de COHb liofilizată, solubilizată, în vederea obținerii unei culori similare preparatelor clasice s-au obținut nouă variante de bradt, astfel: varianta XB-1, obținută cu 1ml din soluția stoc (conținând 0,2 g pudră) și 1000 g carne de pui; varianta XB-1,5, obținută cu 1,5ml din soluția stoc (conținând 0,3 g pudră) la 1000 g carne de pui; varianta XB-2, obținută cu 2ml din soluția stoc (conținând 0,4 g pudră) și 1000 g carne de pui; varianta XB-5, obținută cu 5ml din soluția stoc (conținând 1 g pudră) și 1000 g carne de pui; varianta YB-1, obținută cu 1ml din soluția stoc (conținând 0,2 g pudră) și 1000 g carne de porc; varianta YB-1,5, obținută cu 1,5ml din soluția stoc (conținând 0,3 g pudră) și 1000 g carne de porc; varianta YB-2, obținută cu 2ml din soluția stoc (conținând 0,4 g pudră) și 1000 g carne de porc; varianta YB-5, obținută cu 5ml din soluția stoc (conținând 1 g pudră) și 1000 g carne de porc și varianta YB-7, obținută cu 7ml din soluția stoc (conținând 1,4 g pudră) și 1000 g carne de porc și două probe martor (XM - probă martor realizată clasic cu NaNO<sub>2</sub> convențional, adăugat în proporție de 15 mg la 1000 g carne pui și YM - probă martor realizată clasic cu NaNO<sub>2</sub> convențional, adăugat în proporție de 15 mg la 1000 g carne porc). Cele nouă variante de bradt (XB-1, XB-1,5, XB-2, XB-5; YB-1, YB-1,5, YB-2, YB-5 și YB-7) cât și probele martor (XM și YM) 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 bradt-ului. Pudra pe bază de COHb liofilizată, solubilizată, a fost adăugată la etapa de cuterizare.

### **Experimente efectuate**

- *Evaluarea vizuală a culorii pentru cele nouă variante (XB-1, XB-1,5, XB-2, XB-5; YB-1, YB-1,5, YB-2, YB-5 și YB-7) și pentru probele martor (XM și YM)*

Culoarea pentru cele nouă variante de bradt obținute cu pudră pe bază de COHb liofilizată, solubilizată (XB-1, XB-1,5, XB-2, XB-5; YB-1, YB-1,5, YB-2, YB-5 și YB-7) și pentru probele martor (XM și YM) a fost analizată vizual. S-a observat că intensitatea culorii (roz-pal pentru bradt-ul din carne de pui, respectiv roz-roșiatic pentru bradt-ul din carne de porc) este proporțională cu cantitatea de pudră pe bază de COHb liofilizată (solubilizată) adăugată. Variantele XB-1, XB-1,5, XB-2; YB-1, YB-1,5 și YB-2 au o culoare fezabilă (pot satisface consumatorii în funcție de preferințele acestora în ceea ce privește culoarea preparatelor din carne), în timp ce varianta XB-5 prezintă o culoare prea roșie pentru un preparat din carne de pui, iar variantele YB-5 și YB-7 prezintă o culoare foarte întunecată, nedorită, ce reduce acceptabilitatea produselor din carne.

- *Evaluarea culorii prin determinarea parametrilor L\*, a\* și b\* pentru cele nouă variante (XB-1, XB-1,5, XB-2, XB-5; YB-1, YB-1,5, YB-2, YB-5 și YB-7) și pentru probele martor (XM și YM)*



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 parametrii  $L^*$  - 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 probele martor (XM și YM) și pentru fiecare variantă (XB-1, XB-1,5, XB-2, XB-5; YB-1, YB-1,5, YB-2, YB-5 și YB-7) au fost efectuate câte șase măsurători pe felii cu grosimea de 1 cm [Xu și al., 2016]. Valorile înregistrate pentru parametrii  $L^*$ ,  $a^*$  și  $b^*$  sunt prezentate în Tabelele 1 și 2.

Tabelul 1. Valorile parametrilor de culoare  $L^*$ ,  $a^*$  și  $b^*$  pentru variantele din carne de pui

Proba control / Varianta	$L^*$	$a^*$	$b^*$
XM	75,10	4,60	9,58
XB-1	72,88	4,97	11,12
XB-1,5	71,83	5,25	10,99
XB-2	71,05	5,79	11,31
XB-5	66,06	9,06	10,45

Tabelul 2. Valorile parametrilor de culoare  $L^*$ ,  $a^*$  și  $b^*$  pentru variantele din carne de porc

Proba control / Varianta	$L^*$	$a^*$	$b^*$
YM	67,32	12,90	8,64
YB-1	66,56	8,31	9,80
YB-1,5	65,44	8,91	9,70
YB-2	65,16	9,10	10,01
YB-5	62,48	9,35	9,77
YB-7	60,76	11,49	9,28

Parametrii  $L^*$ ,  $a^*$  și  $b^*$  au o contribuție importantă la impresia totală a culorii. Din Tabelele 1 și 2, se observă că în cazul celor nouă variante: XB-1, XB-1,5, XB-2, XB-5 (din carne de pui), YB-1, YB-1,5, YB-2, YB-5, YB-7 (din carne de porc), luminozitatea (parametrul  $L^*$ ) scade odată cu creșterea cantității de pudră pe bază de COHb liofilizată (solubilizată) adăugată; în timp ce componenta roșie (parametrul  $a^*$ ) crește proporțional. Comparativ cu probele martor (XM - proba martor din carne de pui realizată clasic cu  $\text{NaNO}_2$  convențional și YM - proba martor din carne de porc realizată clasic cu  $\text{NaNO}_2$  convențional), variantele XB-1, XB-1,5, XB-2, XB-5 (din carne de pui) au prezentat valori mai mici pentru parametrul  $L^*$ , dar mai mari pentru parametrul  $a^*$ , în timp ce pentru variantele YB-1, YB-1,5, YB-2, YB-5, YB-7 (din carne de porc) s-au înregistrat valori mai mici pentru ambii parametri  $L^*$  și  $a^*$ . În ceea ce privește componenta cromatică  $a^*$ , varianta XB-5 a prezentat o valoare prea mare, respectiv 197% față de proba martor (XM) (Tabelul 1), ceea ce duce nerecomandarea acestei concentrații, fiind mult prea roșie pentru un preparat din carne de pui. În ceea ce privește variantele obținute din carne de porc (YB-1, YB-1,5, YB-2, YB-5 și YB-7), variantele YB-5 și YB-7 au prezentat valorile cele mai mari pentru parametrul  $a^*$  (72,48%, față de proba martor, pentru varianta YB-5 și 89% pentru varianta YB-7) dar acestea sunt cele mai întunecate (maro închis), fapt ce conduce la nerecomandarea lor (Tabelul 2).

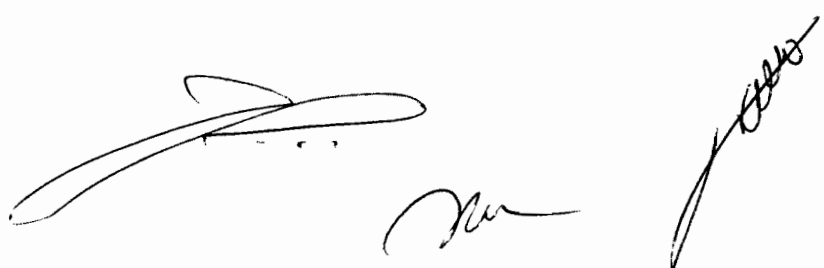
### Concluzii

Pudra pe bază de carboxihemoglobină (COHb) liofilizată obținută prin barbotarea controlată a CO într-un concentrat eritocitar (obținut din sânge de origine animală, recoltat aseptice pe EDTA ca anticoagulant) reconstituit cu soluție izotonă de NaCl poate fi utilizată drept colorant, în vederea înlocuirii  $\text{NaNO}_2$  convențional ce se adaugă în produsele din carne. Autorii propun variantele obținute cu 1 ml, 1,5 ml și 2 ml pudră pe bază de COHb liofilizată (solubilizată cu soluție izotonă de NaCl) pentru obținerea preparatelor din carne.



**Bibliografie**

1. Bredahl L. 2004. Cue utilisation and quality perception with regard to branded beef. *Food Qual Pref*, 15, 65-75.
2. Carpenter CE., Cornforth DP., Whittier D. 2001. Consumer preferences for beef color and packaging did not affect eating satisfaction. *Meat Science*, 57, 359-363.
3. 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.
4. Gangolli SD., van den Brandt PA., Feron VJ., Janzowsky C., Koeman JH., Speijers GJA., Spiegelhalter B, Walker R, Wisnok JS. 1994. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *European Journal of Pharmacology Environmental Toxicology and Pharmacology Section*, 292, 1-38.
5. 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.
6. 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.
7. Sanchez-Echaniz J., Benito-Fernandez J., Mintegui-Raso S. 2001. Methemoglobinemia and consumption of vegetables in infants. *Pediatrics*, 107(5), 1024-1028.
8. 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.
9. Stoica M., Alexe P. 2016. *Elemente de proiectare a produselor alimentare noi*. Ed. Academica, Galați, ISBN 978-973-8937-98-7, 278 p.
10. 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.
11. 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.
12. STAS 11581-83.
13. 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.

Three handwritten signatures in black ink, located at the bottom left of the page.

## Revendicări

Invenția cuprinde 4 revendicări:

1. **Procedeul de obținere a pudrei pe bază de carboxihemoglobină (COHb) liofilizată**
2. **Reducerea nitritului rezidual cu 100% (zero nitrit rezidual)**
3. **Utilizarea pudrei pe bază de carboxihemoglobină (COHb) liofilizată la obținerea bradt-ului**
4. **Utilizarea bradt-ului obținut cu pudră pe bază de carboxihemoglobină (COHb) liofilizată la preparatele comune din carne cu structură omogenă și eterogenă**

## Revendicare independentă.

**Pudra pe bază de carboxihemoglobină (COHb) liofilizată** stabilă, destinată obținerii preparatelor din carne, **caracterizată prin aceea că** 0,4 părți concentrat eritrocitar obținut prin centrifugarea (5000 rpm, 20°C, 10 minute) a una parte sânge (aseptic prelevat, stabilizat cu 0,01 părți EDTA) și reconstituite cu 0,6 părți soluție de clorură de sodiu izotonă (0,85%) sunt controlat barbotate cu 0,08 părți CO (0,01 părți / minut, 8 minute), (cu agitarea concentratului reconstituit) și liofilizate, părțile fiind exprimate în greutate, se prezintă ca o pudră fină, de culoare roșu strălucitor, oferă preparatelor din carne **culoare roz-pal** (specifică preparatelor din carne de pui) și **roz-roșiatic** (specifică preparatelor din carne de porc) și contribuie la obținerea preparatelor din carne cu nivel **zero de nitrit rezidual**.

## Revendicările dependente.

### Revendicarea 1.

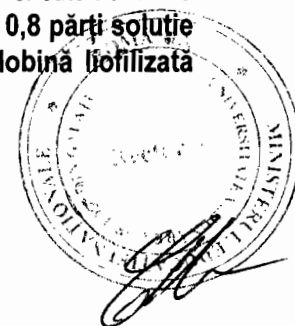
**Procedeul de obținere a pudrei pe bază de carboxihemoglobină (COHb) liofilizată este caracterizat prin aceea că** 0,4 părți concentrat eritrocitar obținut prin centrifugarea (5000 rpm, 20°C, 10 minute) a una parte sânge (aseptic prelevat, stabilizat cu 0,01 părți EDTA) și reconstituite cu 0,6 părți soluție de clorură de sodiu izotonă (0,85%) sunt controlat barbotate cu 0,08 părți CO (0,01 părți / minut, 8 minute), (cu agitarea concentratului reconstituit) și liofilizate, părțile fiind exprimate în greutate, în vederea obținerii unei carboxihemoglobine (COHb) stabile.

### Revendicarea 2.

**Reducerea nitritului rezidual cu 100%, zero nitrit rezidual** prin înlocuirea nitritului convențional cu pudră pe bază de carboxihemoglobină (COHb) liofilizată reprezintă o strategie de diminuare a expunerii consumatorilor la nitritul de sodiu și o soluție tehnologică viabilă, culoarea roz-pal / roz-roșiatic a preparatelor din carne obținute cu această pudră fiind asemănătoare preparatelor din carne obținute cu nitrit convențional.

### Revendicarea 3.

**Utilizarea pudrei pe bază de carboxihemoglobină (COHb) liofilizată la obținerea bradt-ului.** Bradt-ul cu pudră pe bază de carboxihemoglobină (COHb) liofilizată, caracterizat prin aceea că este constituit din 100 părți carne, **0,2 părți pudră pe bază de carboxihemoglobină liofilizată (solubilizată cu 0,8 părți soluție de clorură de sodiu izotonă)** sau **0,3 părți pudră pe bază de carboxihemoglobină liofilizată**





(solubilizată cu 1,2 părți soluție de clorură de sodiu izotonă) sau 0,4 părți părți pudră pe bază de carboxihemoglobină liofilizată (solubilizată cu 1,6 părți soluție de clorură de sodiu izotonă), 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-pal / roz-roșiatic în funcție de sursa de carne și de cantitatea de pudră pe bază de carboxihemoglobină liofilizată adăugată, respectiv 0,2 părți sau 0,3 părți sau 0,4 părți, cu nivel **zero** de **nitrit rezidual**.

#### Revendicarea 4.

Utilizarea bradt-ului obținut cu pudră pe bază de carboxihemoglobină (COHb) liofilizată 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 pudră pe bază de carboxihemoglobină (COHb) liofilizată**, 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 pudrei pe bază de carboxihemoglobină liofilizată și mărunțire ultrafină printr-o trecere în moara coloidală, poate fi utilizat la orice tip de preparat din carne cu structură omogenă și eterogenă.

