



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00864

(22) Data de depozit: 05/12/2019

(41) Data publicării cererii:  
30/06/2021 BOPI nr. 6/2021

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,  
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,  
ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.297, BL.15A, SC.A,  
ET.1, AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• BALA IOANA, STR.POIANA CU ALUNI,  
NR.1, BL.4, SC.4, ET.4, AP.60, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• BĂRBIERU OTILIA GABRIELA,  
STR.GHEORGHE DOJA, NR.5, BL.7A, SC.4,  
ET.1, AP.62, GALAȚI, GL, RO;  
• DIMITRIU LUMINIȚA, ALEEA BARAJULUI  
BICAZ, NR.9, BL.M31, SC.B, ET.2, AP.408,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• TRITEAN NAOMI, STR.PERFEȚIONĂRII,  
NR.11, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) FILM BIOACTIV PENTRU CREȘTEREA DURATEI  
DE PĂSTRARE A FRUCTELOR

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de film bioactiv comestibil, realizat pe baza chitosanului provenit din ciuperci, în special din subproduse de la creșterea ciupercilor, destinat creșterii duratei de păstrare a fructelor. Filmul bioactiv conform invenției este alcătuit din 80...84,5 grame chitosan din ciuperci, cu masa moleculară de 260 kDa și gradul de deacetilare de 15%, 10...15 grame de miere de albine polifloră, cu

activitatea apei de sub 50% și o activitate glucozoxidăzică de minim 2 unități pe 100 grame, 50...500 mg de extract polifenolic standardizat, cu activitate antioxidantă exprimată ca putere de reducere a ionilor ferici de cel puțin 66% și apă reziduală până la 100 de grame.

Revendicări: 3



7

## FILM BIOACTIV PENTRU CREȘTEREA DURATEI DE PĂSTRARE A FRUCTELOR

Prezenta invenție se referă la o compoziție de film bioactiv comestibil, realizat pe baza chitosanului provenit din ciuperci, în special din subproduse de la creșterea ciupercilor, destinat creșterii duratei de păstrare a fructelor.

Sunt cunoscute filme bioactive realizate din chitosan care sunt utilizate pentru extinderea duratei de păstrare a diferitelor produse alimentare, inclusiv fructe și legume. Filmele bioactive pe bază de chitosan limitează modificările calitative ale produselor tratate, previn dezvoltarea microorganismelor, mențin activitatea antioxidantă a produselor vegetale și le prelungesc durata de valabilitate (Wang et al. 2018, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 395-413).

Cererea de brevet WO2016003295 se referă la un film biopolimeric produs dintr-o soluție de alfa și/sau beta chitosan și acizi organici, în special acid acetic, destinat acoperirii fructelor și legumelor, proaspete sau pre-fierte. Odată acoperite cu filmul de chitosan, fructele și / sau legumele sunt introduse în recipiente perforate din PET reciclabil și depozitate la 3°C. Brevetul SUA US5633025 prezintă un film bioactiv format din derivați de chitosan, glicolchitosan sau carboximetilchitosan, și drojdii antagoniste, *Candida oleophila*, *Candida saitoana*, *Candida sake*, *Candida tinus*, *Candida utilis* și *Pichia guilliermondii*. Brevetul RO 128966 B1 descrie un film bioactiv destinat ambalării produselor alimentare, care este obținut din 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. Cererea de brevet IN 201731010421 A protejează o compoziție pe bază de chitosan, nanoparticule de cupru și mentol, pentru prelungirea duratei de păstrare a fructelor climatice (la care etilena produsă post-recoltare are rol în maturare), selectate din grupul căpșuni, măr, portocale, tomate și dovlecei, preferabil tomate (*Solanum lycopersicum*).

În majoritatea situațiilor în care se utilizează bioproduse pe bază de chitosan, se asociază chitosanul cu alți agenți bioactivi, cum ar fi extracte de microorganismele antagoniste microorganismelor dăunătoare (Zhang et al. 2018,



Adoni

*Trends in Food Science & Technology*, 78, 180-187) sau uleiurile esențiale (Tovar et al. 2018. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 61-76). Chitosanul mărește durata de păstrare a fructelor datorită unor acțiuni combinate – formare film, elicitare a răspunsului de apărare din țesuturile vegetale și acțiune antimicrobiană (Romanazzi, et al. 2018, *Frontiers in Microbiology*, 9, 2745). În consecință, îmbunătățirea / amplificarea acțiunii sale implică creșterea eficienței formării filmului, amplificarea elicitării răspunsului de apărare din plante și accentuarea activității antimicrobiene.

Majoritatea bioproduselor pe bază de chitosan realizate până în prezent sunt pe bază de chitosan din crustacee marine (McInnis et al. 2018, *Coatingstech*, 15, 36-43). Aceasta generează o serie de dezavantaje, datorită solubilității reduse în apă, proprietăților mecanice slabe ale filmelor de chitosan (Zivanovic et al. 2007, *Biomacromolecules*, 8, 1505-1510), ca și lipsei de reproductibilitate a sintezei și proprietăților filmelor bioactive, datorită diferențelor de masă, grad de deacetilare și cristalinitate a chitosanului provenit din crustacee marine (Philibert et al. 2017. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181, 1314-1337).

O soluție pentru îmbunătățirea caracteristicilor mecanice ale chitosanului este utilizarea chitosanului provenit din ciuperci. Chitosanul obținut din ciuperci are proprietăți mecanice superioare și asigură o reproductibilitate mai bună a sintezei și proprietăților filmelor bioactive, datorită gradului de deacetilare mare și unui tipar de deacetilare uniform (Ghormade et al. 2017, *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1415-1421). De asemenea, chitosanul din ciuperci (macro sau micro-micete) are o capacitate superioară de inducere a răspunsului de apărare, (Sharif et al. 2018. *Molecules*, 23, 872).

Chitosanul are acțiuni multiple asupra plantelor de cultură, inclusiv acțiune de biostimulant pentru plante (Pichyangkura și Chadchawan 2015. *Scientia Horticulturae*, 196, 49-65). Biostimulanții pentru plante sunt o nouă clasă de produse utilizate ca inputuri în tehnologiile de cultură a plantelor, care determină: creșterea eficienței de preluare și utilizare a nutrienților de către plante, mărirea rezistenței la factorii de stres abiotici și îmbunătățirea calității recoltei (du Jardin, 2015. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14). Acțiunea de biostimulant pentru plante a chitosanului este datorată și caracteristicilor sale de elicitor, respectiv de agent de activare a răspunsului de apărare din plante, datorită caracteristicilor

(microbial associated molecular patterns) – tipar molecular asociat microbilor (Iriti & Faoro, 2009, *Plant Signaling & behavior*, 4(1), 66-68). Mecanismul acțiunii antimicrobiene și de elicitare a răspunsului de apărare din plante al chitosanului este prin modularea speciilor reactive de oxigen (Lopez-Moya, et al 2019, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 332).

Problema tehnică pe care o rezolvă această invenție este de a realiza un film bioactiv comestibil, realizat din chitosan provenit din subproduse de la creșterea ciupercilor, care să aibă caracteristici mecanice superioare și care să inducă eficient sistemele de apărare din plante prin modularea speciilor de reactive de oxigen.

Autorii au găsit că asocierea chitosanului obținut din ciuperci cu miere și polifenoli determină o îmbunătățire a caracteristicilor mecanice ale filmelor bioactive, o amplificare a efectelor de activare a răspunsului activității microbiene și o accentuare a activității antimicrobiene.

Compoziția de film bioactiv este alcătuită din 80 – 84,5 grame chitosan din ciuperci, cu masa moleculară de 260 kDa și gradul de deacetilare de 15%, 10-15 grame de miere de albine polifloră, cu activitatea apei de sub 50% și o activitate glucozoxidază de minim 2 unități pe 100 grame, 50-500 mg de extract polifenolic standardizat, cu o activitate antioxidantă exprimată ca putere de reducere a ionilor ferici de cel puțin 66%, și apă reziduală până la 100 de grame.

1 unitate enzimatică de glucozoxidază este acea cantitate de enzimă care produce 1 micromol de apă oxigenată atunci când acționează asupra  $\beta$ -D-glucozei cu transformare în D-glucono- $\delta$ -lactonă, la 25°C și pH=7.0.

Plantele pe care se aplică tratamentul sunt căpșun, zmeur, afin, mur, agris, aronia, merișor, măr.

Compoziția de film bioactiv realizată conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Are proprietăți mecanice superioare datorită efectului plastifiant al mierii asupra filmului bioactiv de chitosan;
- ✓ Are un efect antimicrobian superior datorită acțiunii combinate a chitosanului, apei oxigenate formate de glucozoxidaza din miere și polifenoli;
- ✓ Are efect de biostimulant pentru plante, datorită acțiunii complementare de modulare a nivelului de radicali liberi, exercitate de chitosan și polifenoli.



În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

*Exemplu 1.* Într-un vas de sticlă Simax® de 3 litri (Kavalier, Sazava, Cehia), prevăzut cu manta de termostatare, agitare mecanică și refrigerent se solubilizează chitosanul extras din butoni de ciuperci *Agaricus bisporus*, (260 kDa, grad de acetilare 15 %). Acesta este dizolvat în soluție de acid acetic 0,7 % pentru a forma 1 kg soluție 2 %. Soluția de chitosan de 2% este încălzită la 30°C și se adaugă 24,25 grame miere cu un conținut de 17,5% apă și o activitate a apei de sub 50%. Se omogenizează compoziția. Se adaugă 50 mg de extract de polifenoli de extract polifenolic standardizat, cu o activitate antioxidantă exprimată ca putere de reducere a ionilor ferici de cel puțin 66%. Un exemplu de astfel de extract este Craft® Extract Powder (Iprona, Lana, Italia), dar orice extract polifenolic cu proprietăți similare poate fi folosit.

Din compoziția rezultată se formează un film prin turnare, iar filmului astfel format i se testează proprietățile mecanice, comparativ cu un film format numai din 2% chitosan. Rezistența la tracțiune și alungirea maximă la rupere cresc cu peste 50% față de filmul numai din chitosan, iar modul Young scade la circa 40% din valoarea filmului numai din chitosan. A fost testată și permeabilitatea la apă, care scade la compoziția conform invenției față de martorul film chitosan. Proprietățile mecanice ale filmului conform compoziției se îmbunătățesc semnificativ.

Față de chitosan produsul are și o activitate semnificativ mărită (cu peste 75%) de inhibare a principalilor fitopatogeni, *Penicillium expansum* și *Botrytis cinerea*. Filmul conform invenției induce un nivel cu 25% superior de specii reactive de oxigen și de oxid nitric în țesuturile vegetale tratate – oxidul nitric fiind recunoscut ca fiind factorul semnal care reglează răspunsul țesuturilor vegetale la agenții fitopatogeni fungali, amorsarea producerii sale determinând o rezistență crescută (Martínez-Medina et al. 2019, *Journal of Experimental Botany*, 70, 4489-4503),

Produsul rezultat se aplică la căpșun prin sporire, cu pompă de mână și determină o creștere cu zece zile a duratei de păstrare la 4°C, față de căpșunile tratate cu un film numai pe bază de chitosan din crustacee.

*Exemplu 2.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că se introduc 500 mg extract standardizat. Produsul rezultat prezintă aceleași caracteristici mecanice îmbunătățite și are caracteristici de inducere a răspunsului de apărare



și antifungice superioare produsului realizat conform Ex. 1. Produsul se aplică pe fructe de zmeur.

*Exemplu 3.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că produsul se aplică pe fructe de afin.

*Exemplu 4.* Se lucrează la fel ca în exemplul 2, cu diferența că produsul se aplică pe fructe de mur.

*Exemplu 5.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că produsul se aplică pe fructe de agriș.

*Exemplu 6.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că produsul se aplică pe fructe de aronia.

*Exemplu 7.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că produsul se aplică pe fructe de merișor.

*Exemplu 8.* Se lucrează la fel ca în exemplul 2, cu diferența că soluția produsul se aplică pe fructe de măr.



## Revendicări

1. Compoziție de film bioactiv conform invenției **caracterizată prin aceea că** este alcătuită din 80 – 84,5 grame chitosan din ciuperci, cu masa moleculară de 260 kDa și gradul de deacetilare de 15%, 10-15 grame de miere de albine polifloră, cu activitatea apei de sub 50% și o activitate glucozoxidazică de minim 2 unități pe 100 grame, 50-500 mg de extract polifenolic standardizat, cu o activitate antioxidantă exprimată ca putere de reducere a ionilor ferici de cel puțin 66%, și apă reziduală până la 100 de grame.
2. Film bioactiv conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** 1 unitate enzimatică de glucozoxidază este acea cantitate de enzimă care produce 1 micromol de apă oxigenată atunci când acționează asupra  $\beta$ -D-glucozei cu transformare în D-glucono- $\delta$ -lactonă, la 25°C și pH=7.0.
3. Film bioactiv conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** se realizează la căpșun, zmeur, afin, mur, agriș, aronia, merișor, măr.

