



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0618894-0 A2**

(22) Data de Depósito: 21/11/2006
(43) Data da Publicação: 20/09/2011
(RPI 2124)



(51) *Int.Cl.:*
A23L 3/3436
B65D 81/26
A23L 3/3571

(54) **Título:** ABSORVEDOR DE OXIGÊNIO MICROBIANO

(30) **Prioridade Unionista:** 21/11/2005 US 60/738,031,
21/11/2005 DK PA200501623, 21/11/2005 DK PA200501623,
21/11/2005 US 60/738,031

(73) **Titular(es):** ARLA FOODS AMBA, CHR. HANSEN A/S

(72) **Inventor(es):** Grith Mortensen, Henrik Skou Pedersen, Mette
Nortoft Kristensen, Niels Kristian Sorensen, Soren K. Lillevang, Torben
Lohse Friis

(74) **Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT DK2006000648 de
21/11/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/057026de
24/05/2007

(57) **Resumo:** ABSORVEDOR DE OXIGÊNIO MICROBIANO A presente invenção refere-se a embalagem e método aperfeiçoados para prolongar a vida de útil e a qualidade de alimento embalado, compreendendo o uso de um absorvedor de oxigênio microbiano.



PI0618894-0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ABSORVEDOR DE OXIGÊNIO MICROBIANO**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se aos campos de materiais de embalagem, de microbiologia e métodos para a preservação de produtos alimentícios.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 Um ampla faixa de métodos é usada para a preservação de produtos alimentícios. Dentre esses métodos, estão a aplicação de preservantes antimicrobianos, por exemplo, produtos químicos, tais como nitrato, dióxido de enxofre, ácido benzóico e proteínas, tais como nisina e pediocina. Outro método é a adição de um antioxidante, tal como ácido ascórbico, ácido cítrico e tocoferóis. Antioxidantes previnem a oxidação de alimentos, que, de outro modo, resultaria em rancidez e descoloração.

15 A patente européia de número 0 092 183 B1 descreve um método para preservação de alimento por fornecimento de uma cultura no alimento contendo lactose, que gera uma substância inibidora do estrago bacteriano.

20 O documento WO 01/52668 descreve bactérias de ácido láctico contendo porfirina e sua aplicação para a redução do teor em oxigênio em um produto alimentício.

25 O oxigênio é o principal fator de deterioração da qualidade com relação a muitos produtos alimentícios. O oxigênio pode causar o crescimento de bolores e o desenvolvimento de flavorizantes desagradáveis rançosos, que, subseqüentemente, reduzem a qualidade e a vida de útil de muito produtos alimentícios. Portanto, é desejável reduzir o teor em oxigênio no ar que entre em contato com o produto alimentício dentro da embalagem. A embalagem em atmosferas modificadas com baixo oxigênio residual foi introduzida, a fim de reduzir as mudanças de qualidades associadas com a
30 presença de oxigênio.

Atualmente, o nível de oxigênio residual em alimentos embalados pode ser reduzida por meio das seguintes abordagens:

• Repetição de ciclos de vácuos e de lavagem com gás, para reduzir o teor em oxigênio residual. Esse método é oneroso tanto com relação às quantidades de gás usado e ao tempo usado para os ciclos de lavagem com gás. Portanto, resultam em aumentos significativos em custos de
5 embalagem.

• Uso de um absorvedor de oxigênio químico. Os sistemas atuais utilizam um ou mais dos seguintes conceitos: oxidação com pó de ferro, oxidação com ácido ascórbico, oxidação com corante foto-sensível, oxidação enzimática (por exemplo, glicose oxidase e álcool oxidase), ácidos
10 graxos insaturados (por exemplo, ácido oléico ou ácido linolênico), ou levedura imobilizada em um material sólido (Vermeiren et al., 1999, 2003). A maioria dos absorvedores de oxigênio químico comercialmente comuns é baseada na oxidação do pó de ferro. Adicionalmente, a remoção enzimática do oxigênio foi proposta como uma técnica promissora (Vermeiren et al.,
15 1999, 2003). Os materiais que absorvem oxigênio são incorporados em rótulos, sachês ou no material de embalagem. As desvantagens desses sistemas são que a eficiência de absorvedor é freqüentemente baixa e que o tempo usado antes que o sistema seja ativado é inaceitavelmente longo. Além disso, aspectos legislativos em relação aos produtos alimentícios, em
20 alguns casos, impedem a aplicação desses sistemas.

Produtos alimentícios embalados a vácuo ou com uma atmosfera modificada são suscetíveis a defeitos de embalagem, e o oxigênio entra na embalagem na abertura da embalagem, durante o uso. Além disso, a obtenção de baixo teor em oxigênio residual no processo de embalagem é
25 consumidora de tempo e onerosa.

Portanto, existe uma demanda dentro da indústria de alimentos em se encontrar meios alternativos ou suplementares de se reduzir o teor em oxigênio residual em alimentos embalados. Tais meios alternativos de redução do teor em oxigênio residual têm que cumprir a legislação regulatória de alimentos, assim como, as preferências do consumidor.
30

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Conseqüentemente, a presente invenção fornece um método

para a preservação de um produto alimentício por embalagem do dito produto em um material de embalagem, em conjunto com um absorvedor de oxigênio microbiano.

5 Portanto, em um aspecto, a invenção está relacionada a um produto alimentício embalado em um material de embalagem, em conjunto com um absorvedor de oxigênio microbiano.

A presente invenção também fornece meios de crescimento contendo microorganismos capazes de reduzir o teor em oxigênio na embalagem. O absorvedor de oxigênio microbiano é, de preferência, microorganismos que consomem oxigênio, com pouca ou nenhuma produção concomitante de dióxido de carbono e ácidos orgânicos. Um exemplo de um tal microorganismo é uma cepa de *Lactococcus lactis*, que usa oxigênio e produz quantidades limitadas de diacetila e de acetoína.

10

Em uma concretização preferida da invenção, o absorvedor de oxigênio microbiano é aplicado à superfície do alimento. Em outra concretização preferida da invenção, o absorvedor de oxigênio microbiano é aplicado a um sachê, rótulo, cápsula ou como péletes liofilizados colocados dentro da embalagem de uma maneira a minimizar a transferência do dito absorvedor de oxigênio microbiano para o alimento. Em outra concretização, o absorvedor de oxigênio microbiano é incorporado ao material de embalagem, por exemplo, em uma estrutura laminada ou um revestimento. Em outro aspecto, a presente invenção fornece um produto alimentício, que tem um baixo teor em oxigênio dentro da embalagem, mesmo depois que o consumidor tiver aberto repetidamente a embalagem.

15

20

25 Uma vantagem da presente invenção é que pode ser usada velocidade de máquina de embalagem aumentadas porque o oxigênio residual, no momento da embalagem, pode estar aumentado. Outra vantagem é que o teor em oxigênio dentro da embalagem de alimento pode ser repetidamente diminuído depois da abertura e do fechamento da embalagem.

30 DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1a é uma ilustração esquemática da incorporação de um absorvedor de oxigênio microbiano em uma material de embalagem para

alimentos,

A Figura 1b é uma ilustração esquemática do absorvedor de oxigênio microbiano sendo aspergido na superfície do material de embalagem voltado para o alimento,

5 A Figura 1c mostra uma aplicação alternativa de um absorvedor de oxigênio microbiano de acordo com a invenção,

A Figura 2 mostra o teor em oxigênio medido em amostras armazenadas 0 - 20 dias, a 9°C. Linhas pontilhadas com pontos brancos são amostras sem o absorvedor de oxigênio microbiano. Linhas sólidas com
10 pontos pretos são amostras com o absorvedor de oxigênio microbiano. Determinações triplas. Medições consecutivas foram realizadas na mesma embalagem ao longo do experimento, e

A Figura 3 mostra o teor em oxigênio medido em amostras armazenadas 0 - 20 dias, a 20°C. Linhas pontilhadas com pontos brancos são
15 amostras sem o absorvedor de oxigênio microbiano. Linhas sólidas com pontos pretos são amostras com o absorvedor de oxigênio microbiano. Determinações triplas. Medições consecutivas foram realizadas na mesma embalagem ao longo do experimento.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

20 A Figura 1a mostra um produto alimentício perecível 10 armazenado dentro de uma embalagem 20 compreendendo uma parte superior conformada 22 formada a partir de um material em camadas 22' e tendo um filme 28 ligado a uma borda periférica 26 do mesmo. Conforme mostrado, uma parte de fundo similar a bandeja 27 pode ser encaixada na borda 26.

25 O material em camadas 22' da parte superior 22 pode compreender três camadas 23, 24, 25 com uma camada superior ou exterior 23 definindo uma barreira adaptada para prevenir, de uma maneira convencional, a entrada na embalagem 20 de ar, que conduziria a um rápido decaimento do produto alimentício 10 e, portanto, reduziria o período no qual o produto
30 10 permanecerá fresco, antes da abertura da embalagem 20, por remoção do filme 28. A camada central ou interna 24 de material em camadas 22' é definida por ou inclui um material absorvente de oxigênio microbiológico, a

ser discutido em maiores detalhes abaixo. Uma camada 25 adicional define uma superfície da embalagem 20 voltada para o produto alimentício 10, e a camada 25 é permeável para permitir a comunicação de gás entre a camada 24 e o lado de dentro da embalagem 20.

5 De preferência, o material para a camada superior 23 e para o filme 28 compreende uma camada de PE para assegurar a selagem. A camada permeável 25 é feita, de preferência, a partir de uma rede de PE perfurada. Observa-se, entretanto, que a embalagem 20 pode ser feita a partir de vidro ou de um metal, com a camada 24 de absorvedor de oxigênio microbi-
10 ano aplicada sobre a sua superfície voltada para dentro. O filme 28 também pode ser definido por um material em camadas tendo propriedades idênticas ou similares ao material em camadas 22'. Em uma concretização, a embalagem 20 pode ter regiões, tais como os lados 21 da parte superior 22, onde nenhum absorvedor de oxigênio microbiano é fornecido.

15 Em uma concretização, mostrada na Figura 1a, a parte superior 22 é feita para reter um formato, onde um espaço vazio 15 relativamente grande é definida entre o produto alimentício 10 e a parte superior 22; a parte superior 22 pode, entretanto, ser conformada tal que o produto alimentício 10 se ajuste firmemente nela.

20 Observa-se que o material em camadas 22' com o absorvedor de oxigênio microbiano é, de preferência, fabricado bem antes da preparação da embalagem 20; no entanto, em alguns casos, tais como quando a vida útil ou atividade da camada de material de absorvedor de oxigênio microbiológico 24 for curta ou crítica, pode se preferir fazer o material em ca-
25 madas 22' imediatamente antes do momento em que a embalagem 20 é selada pelo filme 28, por meio do que se reduz o período de tempo em que a camada de material 24 é exposta ao ar atmosférico.

O material em camadas 22' pode, alternativamente, ser formado sem a camada permeável 25, onde nenhuma proteção ou controle da atividade da camada absorvente de oxigênio microbiológico 24 seja necessária.
30 A Figura 1b mostra um tal exemplo, em que o material em camadas 22' compreende uma camada superior 23, conforme descrita acima, e portando

uma camada de um absorvedor de oxigênio microbiano aspergida ou de outra maneira aplicada à camada 23. Um tal material em camadas 22', para a parte superior 22, pode ser fabricado logo antes que a parte superior 22 seja conformada, tal como por moldagem por injeção ou estampagem profunda.

5 Nas partes acima, a embalagem 20 foi descrita acima como fornecendo um espaço vazio 15 pela embalagem 20, incluindo uma parte 22 adaptada para reter sua forma sob uso normal. Entretanto, o uso de um material de embalagem flexível, incluindo um material absorvente de oxigênio microbiológico e embrulhado em torno do produto alimentício 10, também
10 recai dentro do conceito geral da presente invenção.

 A Figura 1c mostra uma concretização alternativa da invenção, em que uma camada 24 de um material absorvente de oxigênio microbiológico foi aplicado à superfície do produto alimentício 10, a embalagem 20 sendo feita a partir de qualquer material impermeável a gás convencional
15 adaptado para prevenir a entrada de ar na embalagem 20. O material absorvente de oxigênio microbiano pode ser aplicado por aspersão de uma pasta fluida dele por sobre o produto alimentício 10, antes ou durante a embalagem. Opcionalmente, a pasta fluida pode compreender um ou mais nutrientes para o absorvedor de oxigênio microbiano, por exemplo, uma fonte de
20 carbono e/ou de nitrogênio. Quando o alimento for um queijo, a aplicação do absorvedor de oxigênio microbiano por sobre o queijo pode ser seguida pela aplicação sobre o produto alimentício 10 de um revestimento semiimpermeável ao ar, por exemplo, revestimento de plástico holandês, cera de parafina ou outros revestimentos à base de lipídeos.

25 Em ainda outra concretização preferida (não mostrada), o absorvedor de oxigênio microbiano pode ser aplicado a um sachê separado ou rótulo colocado dentro da embalagem 20 da Figura 1c, ou o absorvedor de oxigênio microbiano, de preferência, como péletes de pó liofilizado, pode ser introduzido na embalagem 20 antes de sua selagem. Quando em forma líquida, o absorvedor de oxigênio microbiano pode ser injetado na embalagem
30 20 por perfuração da embalagem 20 e, então, resselagem.

 Produtos alimentícios 10 embalados de acordo com métodos

convencionais freqüentemente perecem rapidamente, devido ao oxigênio presente dentro da embalagem, isto é, ou em um espaço vazio entre a embalagem e o produto alimentício ou dentro do próprio produto alimentício. Embora os produtos alimentícios possam ser embalados a vácuo ou em uma atmosfera modificada, obtendo-se teor em oxigênio residual baixo altamente reduzido nela, o processo de embalagem é consumidor de tempo e oneroso.

O uso de um material absorvedor de oxigênio microbiano, conforme mencionado acima permite uma redução do teor em oxigênio residual pelo absorvedor de oxigênio microbiano assegurando-se que a concentração de oxigênio dentro da embalagem 20 diminua continuamente, de preferência, até a exaustão, seguindo-se o fechamento da embalagem 20. A invenção é útil quando o produto alimentício 10 for embalado a vácuo ou em uma atmosfera modificada e mesmo quando o produto alimentício 10 for embalado em ar atmosférico.

Além disso, uma vida útil prolongada do produto alimentício 10 pode ser assegurada através do efeito do material absorvedor de oxigênio microbiano depois da abertura da embalagem 20 pelo consumidor, quando o acesso de ar atmosférico ao interior da embalagem não mais for restrito.

Observa-se que, independentemente da embalagem 20 selecionada para o produto alimentício 10, o absorvedor de oxigênio microbiano discutido aqui pode ser incorporado ao próprio produto alimentício durante o processo de produção do produto alimentício, para a finalidade de se fornecer uma vida útil prolongada do produto alimentício, portanto, permitindo o uso de qualquer embalagem convencional.

O absorvedor de oxigênio microbiano é, de preferência, selecionado a partir de microorganismos classificados como microorganismos GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros). Dentre os microorganismos classificados como GRAS estão *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Brevibacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Saccharomyces* spp. e *Kluyveromyces* spp.

Muitos microorganismos usam oxigênio durante o seu metabolismo. Entretanto, alguns produzem ácidos, álcoois, gases e compostos fla-

vorizantes durante esse processo, que podem causar mudanças sensoriais e físicas indesejáveis nos alimentos. Em uma concretização da invenção, o absorvedor de oxigênio microbiano usa oxigênio sem reduzir subsequente-mente o pH ou produzir quantidades significativas de gases. Em outra con-cretização, o absorvedor de oxigênio microbiano é um microorganismo que
5 também produz uma mudança no flavorizante do produto alimentício. Essa mudança do flavorizante do produto alimentício pode ser desejável para algumas aplicações, por exemplo, em relação a alguns produtos de laticínios.

Em outra concretização da invenção, o absorvedor de oxigênio
10 microbiano é selecionado a partir de cepas que absorvem oxigênio de *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Brevibacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Bifidobacterium* spp. e levedura spp. Em sua forma natural, essas espécies podem não absorver oxigênio rápido o bastante e, em baixas concentrações de oxigênio, conforme dese-
15 jado quando as utiliza como absorvedoras de oxigênio microbiano de acordo com a presente invenção. A taxa de consumo de oxigênio de microorganismos pode ser aperfeiçoada por mudança dos microorganismos ou por modificações culturais, modificações por introdução de mutações ou por outras modificações genéticas.

20 A primeira opção é fabricar os microorganismos sob condições, nas quais eles adquiram ou aperfeiçoem sua capacidade de absorver (metabolizar) oxigênio. Uma maneira de se realizar isso é fabricar os microorganismos em um meio contendo porfirina, por exemplo, como hemina. Microorganismos podem, desse modo, ser "carregados" com um compostos de
25 porfirina, permitindo aos microorganismos que não contenham compostos de porfirina de maneira natural ou que contenham compostos de porfirina insuficientes, por exemplo, *Lactococcus*, absorverem oxigênio. Faz-se referência ao documento de número WO 01/52668, no qual uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (DSM 12015) foi cultivada em um meio contendo hemina,
30 resultando, assim, em bactérias contendo pelo menos 0,1 ppm em uma base de matéria seca, de um composto de porfirina.

Outra opção para a modificação de um microorganismo, tal co-

mo uma bactéria de ácido láctico, é introduzir uma ou mais mutações que causem um deslocamento no metabolismo, tal que a absorção de oxigênio pelo metabolismo seja aumentada. Em uma concretização, uma bactéria de ácido láctico é deficiente em Ldh, Ldh⁻, isto é, foi introduzida uma mutação

5 que causa uma atividade de lactato desidrogenase deficiente. Cepas de Ldh⁻ não podem regenerar NAD⁺ a partir de NADH por redução de piruvato a ácido láctico, e essas cepas têm que se basear em outras reações para regeneração NAD⁺, por exemplo, NADH oxidase codificada pelo gene *nox*. A regeneração de NAD⁺ por NADH oxidase causa o consumo concomitante de oxigênio.

10 Portanto, em ainda outra concretização, o absorvedor de oxigênio microbiano é uma bactéria de ácido láctico tendo fenótipo Ldh⁻ e superexpressão de NADH oxidase. Em ainda outra concretização, o absorvedor de oxigênio microbiano é uma bactéria de ácido láctico tendo fenótipo de Ldh⁻ e de Pfl⁻, isto é, sendo deficiente em atividades tanto de lactato desidrogenase

15 e de piruvato formato liase. Métodos para produção de tais cepas Ldh⁻ são revelados no documento de número WO 98/54337, nas patentes européias de números 0937774 e 0928333. Esses documentos também descrevem ensaios adequados para a quantificação da taxa de consumo de oxigênio por esses microorganismos. Tipicamente, um líquido, tal como leite desnatado a 30°C é inoculado com uma quantidade apropriada de microorganismos,

20 por exemplo, 10⁷ CFU/mL, e a concentração e oxigênio no líquido é medido ao longo do tempo.

Em ainda outra concretização, o absorvedor de oxigênio microbiano é *Lactococcus lactis*. Em ainda outra concretização, o absorvedor de

25 oxigênio microbiano é um *Lactococcus lactis* que consome oxigênio e não produz ácido láctico. Em ainda outra concretização, o absorvedor de oxigênio microbiano é uma cepa de *Lactococcus lactis* que é Ldh⁻, por exemplo, DN-224 (DSM 11037). Em ainda outra concretização, o absorvedor de oxigênio microbiano é uma cepa de *Lactococcus lactis* que é Ldh⁻ e Pfl⁻, por exemplo,

30 DN-223 (DSM 11036). Em ainda outra concretização, o absorvedor de oxigênio microbiano é uma cepa de *Lactococcus lactis*, que é Ldh⁻ e superexpressa NADH oxidase.

Em outras concretizações, o absorvedor de oxigênio microbiano não produz quantidades significativas de ácido orgânicos e de dióxido de carbono. Em ainda outra concretização, o absorvedor de oxigênio microbiano é *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Em ainda outra concretização, o absorvedor de oxigênio microbiano é uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* que é Ldh⁻. Em ainda outra concretização, o absorvedor de oxigênio microbiano é uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* que é Ldh⁻ e Pfl⁻. Em ainda outra concretização, o absorvedor de oxigênio microbiano é uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* que é Ldh⁻ e superexpressa NADH oxidase.

Em outra concretização da invenção, o absorvedor de oxigênio microbiano é capaz de diminuir a concentração de oxigênio em leite desnatado, a 30°C, desde cerca de 8 mg/Kg a menos do que 1 mg/Kg em menos de 3 horas, depois de se inocular o leite desnatado com 10⁶ CFU/mL do absorvedor de oxigênio microbiano.

Em outra concretização da invenção, o absorvedor de oxigênio microbiano é capaz de diminuir a concentração de oxigênio em uma solução de peptona a 0,1%, NaCl a 0,85% e lactose à 3%, a 30°C, desde cerca de 8 mg/Kg a menos do que 1 mg/Kg em menos de 3 horas, depois de se inocular o leite desnatado com 10⁶ CFU/mL do absorvedor de oxigênio microbiano.

Uma ampla variedade de produtos alimentícios pode ser preservada de acordo com a presente invenção. Produtos de laticínios, tais como queijo, são particularmente preferidos. Em uma concretização da invenção, o produto alimentício é selecionado a partir do grupo consistindo em um produto de carne fatiado, uma refeição pronta, incluindo um produto *sous-vide*, ou um produto de panificação.

A presente invenção é adicionalmente ilustrada pelos exemplos seguintes, que, contudo, não devem ser construídos como limitantes do escopo de proteção. As características descritos na descrição anterior e nos exemplos seguintes podem, seja separadamente ou seja em qualquer de suas combinações, ser material de realização da invenção em suas diversas formas.

REFERÊNCIAS

- L. Vermeiren, F. Devlieghere, M. van Best, N de Kruijf, J. Debevere. 1999. Developments in the active packing of foods. Trends in Food Science & Technology 10: 77 - 86.
- 5 L. Vermeiren, F. Heirlings, F. Devlieghere, J. Debevere. 2003. Oxygen, ethylene and other scavengers. In: R. Ahvenainen (Ed.) Novel Food Packing Techniques. Woodhead Publishing, Cambridge, páginas 22 - 49.

EXEMPLOS

Exemplo 1.

- 10 O objetivo era avaliar o efeito do absorvedor de oxigênio microbiano em queijos de baixo teor de gordura e de elevado teor de gordura.

- O absorvedor de oxigênio microbiano *Lactococcus lactis* foi obtido a partir de Chr. Hansen (F-DVS DN-224, depositado sob o número de acesso DSM 11037). Os seguintes meios de crescimento contendo lactose e
- 15 peptona de protease foram produzidos:

Peptona a 0,25%

- 1,0 g de peptona
8,5 de NaCl
2,5 g de lactose
- 20 1.000 de mL de água desmineralizada

Peptona a 0,50%

- 1,0 g de peptona
8,5 de NaCl
5,0 g de lactose
- 25 1.000 de mL de água desmineralizada

Peptona a 0,75%

- 1,0 g de peptona
8,5 de NaCl
7,5 g de lactose
- 30 1.000 de mL de água desmineralizada

Os meios de crescimento foram autoclavados, resfriados para 30°C e 100 g de F-DVS DN-224 foram adicionados. Isso deu uma concen-

tração de 10^8 CFU/mL de bactérias.

Dois tipos de queijo foram avaliados: um queijo semiduro de baixo teor em gordura (5% de gordura na matéria seca) e um queijo semi-duro de elevado teor em gordura (60% de gordura na matéria seca). Os produtos foram fatiados, e a superfície foi aspergida com a suspensão de bactérias. Os queijos foram subsequenteiramente embalados em uma embalagem comercial feita de APET/PE e com uma tampa consistindo em OPA/PE. Foi utilizada uma atmosfera modificada contendo 30 - 3% de CO_2 e um máximo de 0,5% em O_2 , e com N_2 como gás de enchimento. Os produtos foram armazenados a 5°C , no escuro, até o momento da amostragem.

Os produtos foram avaliados depois de 9, 11, 13 e 15 semanas, para o queijo de baixo teor em gordura, e depois de 15, 17, 19 e 21 semanas, com relação ao queijo de elevado teor em gordura. As seguintes avaliações foram realizadas: teor em gases (O_2 e CO_2) e avaliações sensoriais. Além disso, pH, mapeamento de peptídeos e compostos de aroma voláteis foram avaliados depois de 13 e 15 semanas, para o queijo com baixo teor em gordura, e depois de 19 e 21 semanas, com relação ao queijo de elevado teor em gordura.

Os resultados são listados na Tabela 1. Por clareza, somente os resultados depois de 13 e 15 semanas, para os queijos de baixo teor em gordura, e os resultados depois de 19 e 21 semanas, com relação ao queijo de elevado teor em gordura, estão listados. A bateria de testes completa foi aplicada nesses momentos de retirada.

Tabela 1. Efeito do uso de um absorvedor de oxigênio microbiano sobre as propriedades físicas, químicas e sensoriais de queijos semi-duros com baixo teor em gordura e com elevado teor em gordura.

Produto	Absorvedor de O ₂ microbiano	Tempo de armazenamento (semanas)	O ₂ (Nota 1)	CO ₂ (Nota 2)	pH	Diacetila "ppm"	Maapeamento de peptídeos	Avaliações sensoriais
Queijo com baixo teor em gordura	-	13	0,021	20,2	5,60	0,457	Diferenças em perfis de peptídeos de queijos de 13 e 15 semanas são observadas	Flavor e odor foram aperfeiçoados quando do uso do absorvedor de O ₂ microbiano
	+	13	0,013	20,3	5,53	0,625		
	-	15	0,019	20,2	5,53	0,556	Nenhuma diferença em perfis de peptídeos de produtos com e sem absorvedor microbiano foi encontrada	Flavor e odor foram aperfeiçoados quando do uso do absorvedor de O ₂ microbiano
	+	15	0,005	21,4	5,53	0,727		
Queijo com elevado teor em gordura	-	19	0,050	17,2	5,13	1,039	Diferenças em perfis de peptídeos de queijos de 19 e 21 semanas são observadas	Flavor foi aperfeiçoado quando do uso do absorvedor de O ₂ microbiano em combinação com elevadas concentrações de lactose. Nenhuma diferença explicita de odor foi observada
	+	19	0,020	20,7	5,19	0,945		
	-	21	0,040	19,1	5,10	0,674	Leves diferenças em perfis de produtos com e sem absorvedor microbiano foram observadas	Odor foi aperfeiçoado quando do uso do absorvedor de O ₂ microbiano. Nenhuma diferença pronunciada em flavor foi observada
	+	21	0,029	19,0	5,11	0,952		

Nota 1: Somente resulta 0,75% de lactose. A mesma tendência foi observada para as duas outras concentrações de lactose.

Nenhum efeito do absorvedor de oxigênio microbiano sobre o pH foi observado, ou no queijo de baixo teor em gordura ou nos queijos de elevado teor em gordura. O absorvedor pode ter uma leve efeito sobre a maturação de queijos de elevado teor em gordura. Níveis aumentados de diacetila e de acetoína (exemplificados por diacetila na Tabela 1) foram observados nos queijos. Esses compostos têm um efeito positivo sobre o flavorizante de produtos de laticínios. Avaliações sensoriais simples descreveram um efeito positivo do absorvedor de oxigênio microbiano.

Exemplo 2.

O objetivo foi avaliar o efeito do absorvedor de oxigênio microbiano em diferentes níveis de oxigênio residual.

O absorvedor de oxigênio microbiano *Lactococcus lactis* foi obtido a partir de Chr. Hansen (F-DVS DN-224). O seguinte meio de crescimento contendo lactose e peptona de protease foi produzido:

Lactose a 3%

1,0 g de peptona

8,5 de NaCl

30 g de lactose

1.000 de mL de água desmineralizada

O meio de crescimento foi autoclavado, resfriado 20°C e 10 g de F-DVS DN-224 foram adicionados. Isso deu uma concentração de 47×10^7 CFU/mL de bactérias. Uma referência contendo somente a solução de peptona foi usada para comparação.

40 mL de 3% de lactose/peptona em água ou peptona em água com/sem o absorvedor de oxigênio microbiano foram colocados em uma bandeja consistindo em APET/PE e com uma tampa consistindo em O-PA/PE. Três combinações de gás de embalagem foram aplicadas objetivando as seguintes concentrações de oxigênio residuais: 0,3%, 1% e 21% (ar atmosférico). CO₂ era constante em aproximadamente 25% para os gases com oxigênio reduzido e de aproximadamente 0% para o ar atmosférico. N₂ foi usado como um gás de enchimento.

As embalagens foram armazenadas a 9°C e a 20°C durante 0, 7,

12 e 20 dias.

No momento da amostragem, foram medidos o teor em gases (O_2 e CO_2) e o crescimento de *Lactococcus lactis* (ágar M17). O teor em lactose e o pH foram medidos no início e no final do experimento. Medições consecutivas foram realizadas na mesma embalagem ao longo do experimento. Os resultados tiveram suas médias obtidas e se basearam em determinações em triplicata. Os resultados das medições de oxigênio estão listadas nas Figuras 2 e 3.

O absorvedor de oxigênio microbiano reduziu o nível de oxigênio, comparado a um controle sem o absorvedor de oxigênio microbiano. Esse efeito foi observado tanto a 9°C quanto a 20°C.

Exemplo 3.

Foram realizados testes em produtos com o absorvedor de oxigênio microbiano e queijo Cheddar.

O objetivo era avaliar o efeito do absorvedor de oxigênio microbiano em diferentes níveis de oxigênio residual, e com e sem inoculação de *Penicillium camemberti*.

O absorvedor de oxigênio microbiano *Lactococcus lactis* foi obtido a partir de Chr. Hansen (F-DVS DN-224). O seguinte meio de crescimento contendo lactose e peptona de protease foi produzido:

Peptona a 3%

1,0 g de peptona

8,5 de NaCl

30 g de lactose

1.000 de mL de água desmineralizada

O meio de crescimento foi autoclavado, resfriado 20°C e 0,5 g de F-DVS DN-224 foram adicionados. Isso deu uma concentração de 27×10^6 CFU/mL de bactérias. Uma referência contendo somente a solução de peptona/lactose foi usada para comparação.

A cepa de *Penicillium camemberti* estava localizada em Kvibille Dairy e foi cultivada em ágar com DYES (sacarose com extrato de levedura e diclorano). Os esporos foram ressuspensos em água esterilizada para se

obter 10^6 esporos/mL de solução. A solução de *Penicillium camemberti* tinha uma concentração de 12×10^5 esporos/mL.

40 mL de 3% de lactose/peptona em água com/sem o absorvedor de oxigênio microbiano foram colocados em uma bandeja consistindo em APET/PE e com uma tampa consistindo em OPA/PE. Pedacos de Cheddar pesando aproximadamente 100 g foram mergulhados em parafina e secados. O Cheddar foi colocado na bandeja, e metade das amostras foram inoculadas com 10 μ L da suspensão de *Penicillium camemberti*.

Três combinações de gás de embalagem foram aplicadas direcionando as seguintes concentrações de oxigênio residuais: 0,3%, 1% e 21% (ar atmosférico). CO₂ era constante em aproximadamente 25% para os gases com oxigênio reduzido e de aproximadamente 0% para o ar atmosférico. N₂ foi usado como um gás de enchimento.

As embalagens foram armazenadas a 9°C e a 20°C durante 0, 5, 10 e 20 dias.

No momento da amostragem, foram medidos o teor em gases (O₂ e CO₂) e o crescimento de *Lactococcus lactis* (agar M17). O teor em lactose e o pH foram medidos no início e no final do experimento. Medições consecutivas foram realizadas na mesma embalagem ao longo do experimento. Os resultados tiveram suas médias obtidas e se basearam em determinações em duplicata.

Nas amostras somente contendo o absorvedor de oxigênio microbiano, isto é, sem a inoculação de *Penicillium camemberti*, um claro efeito da presença do absorvedor sobre o teor em oxigênio residual foi observado. Quando se compara as amostras tanto com o absorvedor microbiano quanto com o *Penicillium camemberti*, pareceu que o bolor aparentemente usou o oxigênio presente e que os níveis de oxigênio foram reduzidos de maneira significativa nos produtos contendo tanto o absorvedor de oxigênio microbiano quanto o *Penicillium camemberti*, quando comparado a amostras contendo somente o absorvedor de oxigênio microbiano.

Exemplo 4.

O objetivo do experimento é avaliar o efeito do absorvedor mi-

microbiano sobre as mudanças de qualidade causadas por exposição à luz.

Níveis de oxigênio residuais diferentes são testados (entre 0 - 5%). Os queijos são embalados em materiais de embalagem comerciais, o absorvedor de oxigênio microbiano é aspergido sobre as superfícies do queijo, e, subsequentemente, os queijos são embalados em atmosferas modificadas e armazenados em temperaturas refrigeradas, no escuro ou expostos à luz (mimetizando as condições de exposição no varejo). No momento de retirada, o teor em gases (O_2 e CO_2) é avaliado, e avaliações físico-químicas, microbianas e sensoriais relevantes são realizadas.

10 Exemplo 5.

O objetivo do experimento é otimizar o sistema de absorvedor de oxigênio microbiano.

Os seguintes parâmetros são avaliados:

- Diferentes substratos de crescimento (leite, água com peptona, hidrolisados de leite e água)
- Diferentes temperaturas de crescimento (5°C, 9°C e 20°C)
- Concentração ótima de material de absorvedor microbiano (percentagem de inoculação)
- Método de aplicação.

20 Exemplo 6.

O objetivo do experimento é avaliar a combinação ótima de concentração de absorvedor de oxigênio microbiano e teor em oxigênio residual, que pode resultar subsequentemente em velocidades de máquina de embalagem crescentes. O experimento envolve técnicas de aspersão e avaliações de diferentes concentrações de oxigênio (por exemplo, 0,1; 0,3; 1 e 5% de O_2). Finalmente, ocorrem experimentos de aumento de escala com diferentes produtos de laticínios. Outros produtos alimentícios estão também incluídos nas avaliações.

Exemplo 7.

30 Queijo fatiado Delite 5% é colocado em bandejas plásticas e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DN224, em uma solução de lactose/peptona, é aspergido sobre o queijo.

As bandejas plásticas são embaladas com um gás tendo a seguinte composição: 0,4% de O₂ e 43,5% de CO₂.

As concentrações de O₂ e de CO₂ no espaço vazio do queijo embalado são medidas depois da embalagem, assim como depois do experimento.

São usados os seguintes materiais:

Bandejas Nr. Vium (GL440, 400 mu APET / 40 mu PE) e tampas (15 mu OPA / 40 mu PE)

Queijo fatiado Delite 5% a partir de laticínio Nº. Vium.

Composição de gás usado para embalagem: 43,5% de dióxido de carbono e 0,4% de oxigênio.

A solução de lactose/peptona contém:

NaCl	8,5 g
Peptona	1,0 g
Lactose	30,0 g
Água	1 litro

Autoclavado a 121°C durante 45 minutos

O queijo é inoculado com a seguinte quantidade de *Lactococcus lactis* DN-224:

10 g de *Lc. lactis* congelado é adicionado por litro de solução de lactose/peptona. Por cada queijo para embalagem em uma bandeja plástica adiciona-se 1 mL da lactose/peptona por aspersão.

As bandejas plásticas são embaladas (seladas) usando-se um Multivac T200 a partir de Multivac.

Os queijos embalados são incubados a 20°C e a 9°C.

Os seguintes produtos de queijo embalados são preparados:

1. 9 bandejas com queijo, *Lc. lactis* e solução de lactose/peptona.
2. 9 bandejas com queijo e solução de lactose/peptona.
3. 9 bandejas com queijo e água estéril.
4. 9 bandejas com *Lc. lactis* e solução de lactose/peptona.
5. 9 bandejas com solução de lactose/peptona.

REIVINDICAÇÕES

1. Produto alimentício embalado em um material de embalagem em conjunto com um absorvedor de oxigênio microbiano.
2. Produto alimentício, de acordo com a reivindicação 1, em que
5 qualquer gás dentro da embalagem tem um teor de oxigênio reduzido ou igual quando comparado ao ar atmosférico, tal como menor do que 1% de oxigênio, menor do que 0,05% de oxigênio ou menor do que 0,01% de oxigênio.
3. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 2, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é bactéria.
10
4. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é selecionado a partir de cepas que absorvem oxigênio de *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Brevibacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Bifidobacterium* spp. e levedura spp.
15
5. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é *Lactobacillus lactis*.
6. Produto alimentício, de acordo com a reivindicação 5, em que
20 o *Lactobacillus lactis* consome oxigênio e não produz ácido láctico.
7. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, em que o absorvedor de oxigênio microbiano não produz quantidades significativas de ácidos orgânicos e de dióxido de carbono.
8. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é uma cepa tendo o fenótipo Ldh⁻, por exemplo, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DN-224, depositado como DSM 11037.
25
9. Produto alimentício, de acordo com a reivindicação 8, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é uma cepa tendo o fenótipo Pfl⁻, por exemplo, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DN-223, depositado como DSM 11036.
30
10. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivin-

dicações de 1 a 8, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é uma cepa que super-expressa NADH oxidase, por exemplo, uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

5 11. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é uma bactéria de ácido láctico, que tenha sido cultivada na presença de pelo menos um composto de porfirina.

10 12. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*.

13. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, o material de embalagem sendo embrulhado em torno do produto alimentício.

15 14. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, a embalagem incluindo um espaço entre o material de embalagem e o produto alimentício.

20 15. Produto alimentício, de acordo com a reivindicação 14, em que o volume do espaço vazio é desde 10 mL a 200 mL, e o peso do produto alimentício é desde 100 gramas a 1.000 gramas, e a quantidade de absorvedor de oxigênio microbiano aplicada ao produto alimentício é desde 10^3 a 10^9 CFU.

16. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é aplicado à superfície do alimento.

25 17. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é incorporado ao produto alimentício.

30 18. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, em que o material de embalagem é um revestimento, por exemplo, revestimento de plástico holandês, cera de parafina ou outros revestimentos à base de lipídeo, aplicado diretamente por sobre a superfície do produto alimentício com o absorvedor de oxigênio microbiano entre o

produto alimentício e o revestimento, ou com o absorvedor de oxigênio microbiano incorporado no revestimento.

19. Produto alimentício, de acordo com a reivindicação 14, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é aplicado a um sachê, rótulo, cápsula ou como péletes de pó liofilizado colocado dentro do espaço.

20. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é disposto sobre uma superfície do material de embalagem voltada para o produto alimentício.

21. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 20, o qual é um produto alimentício sólido.

22. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 21, o qual é um produto de laticínio.

23. Produto alimentício, de acordo com a reivindicação 22, o qual é um produto alimentício fermentado, tal como um queijo.

24. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 21, o qual é selecionado a partir do grupo consistindo em um produto de carne fatiado, uma refeição pronta, incluindo um produto *sous-vide*, e um produto de panificação.

25. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, embalado em uma atmosfera modificada.

26. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, embalado em ar atmosférico.

27. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a quantidade do produto alimentício dentro da embalagem está na faixa desde 100 gramas a 1.000 gramas, tal como desde 100 gramas a 700 gramas, ou desde 200 gramas a 500 gramas, e sendo que a quantidade de absorvedor de oxigênio microbiano, que é adicionado ao produto alimentício durante a fabricação, é desde 10^3 a 10^{10} CFU.

28. Método para a preservação de um produto alimentício por embalagem do alimento em um material de embalagem, de preferência, um material definindo uma barreira adaptada para prevenir ou para minimizar,

de uma maneira convencional, a entrada na embalagem de ar, em conjunto com um absorvedor de oxigênio microbiano.

29. Método, de acordo com a reivindicação precedente, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é aplicado à superfície do alimento ou é incorporado ao material de embalagem.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é aplicado em uma quantidade desde 10^2 CFU/cm² a 10^7 CFU/cm², tal como 10^3 CFU/cm² a 10^6 CFU/cm², ou desde 10^4 CFU/cm² a 10^5 CFU/cm².

31. Método, de acordo com a reivindicação precedente, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é aplicado por aspersão de uma pasta fluida contendo o absorvedor de oxigênio microbiano sobre o produto alimentício e por sobre o material de embalagem, a pasta fluida opcionalmente compreendendo um ou mais nutrientes para o absorvedor de oxigênio microbiano, por exemplo, uma fonte de carbono e/ou de nitrogênio.

32. Método, de acordo com a reivindicação 28, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é aplicado a um sachê, rótulo, cápsula ou como péletes de pó liofilizado colocados em um espaço entre o produto alimentício e o material de embalagem.

33. Sachê, rótulo, cápsula ou péletes de pó liofilizado compreendendo um absorvedor de oxigênio microbiano e substratos necessários para o absorvedor de oxigênio microbiano assimilar oxigênio quando da exposição a vapor d'água.

34. Embalagem para alimento, compreendendo um material de embalagem e um absorvedor de oxigênio microbiano.

35. Embalagem, de acordo com a reivindicação 34, o dito absorvedor de oxigênio microbiano sendo aplicado, tal como por uma operação de aspersão, sobre uma superfície do material de embalagem adaptado a estar voltado para um compartimento de armazenamento de alimento da embalagem.

36. Embalagem, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 34 a 35, em que o material de embalagem compreende pelo menos

duas camadas, uma definindo uma barreira e outra camada compreendendo o absorvedor de oxigênio microbiano.

37. Embalagem, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, o material de embalagem compreendendo uma camada permeável a gás, a camada compreendendo o absorvedor de oxigênio microbiano estando disposta entre a barreira e a camada permeável a gás.

38. Embalagem, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 34 a 37, o material de embalagem sendo conformado, tal como por moldagem por injeção ou estampagem profunda.

39. Embalagem, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 34 a 37, o material de embalagem sendo flexível.

40. Material de embalagem, de acordo com a reivindicação 37, a dita camada impermeável a gás sendo vidro ou metal.

41. Embalagem ou material de embalagem, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 34 a 40, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é selecionado a partir de cepas que absorvem oxigênio de *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Brevibacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Bifidobacterium* spp. e levedura spp.

42. Embalagem, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 34 a 41, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é *Lactococcus lactis*.

43. Embalagem, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o *Lactococcus lactis* consome oxigênio e não produz ácido láctico.

44. Embalagem, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 34 a 43, em que o absorvedor de oxigênio microbiano não produz quantidades significativas de ácido orgânicos e de dióxido de carbono.

45. Material de embalagem, como definido em qualquer uma das reivindicações de 34 a 44, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é uma cepa tendo o fenótipo Ldh⁻, por exemplo, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DN-224, depositado como DSM 11037.

46. Material de embalagem, de acordo com a reivindicação 45, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é uma cepa tendo o fenótipo Pfl⁻, por exemplo, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DN-223, depositado como DSM 11036.

5 47. Material de embalagem, como definido em qualquer uma das reivindicações de 34 a 46, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é uma cepa que super-expressa NADH oxidase, por exemplo, uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

10 48. Material de embalagem, como definido em qualquer uma das reivindicações de 34 a 47, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é uma bactéria de ácido láctico que tenha sido cultivada na presença de pelo menos um composto de porfirina.

15 49. Material de embalagem, como definido em qualquer uma das reivindicações de 34 a 44, em que o absorvedor de oxigênio microbiano é *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*.

FIG.1a

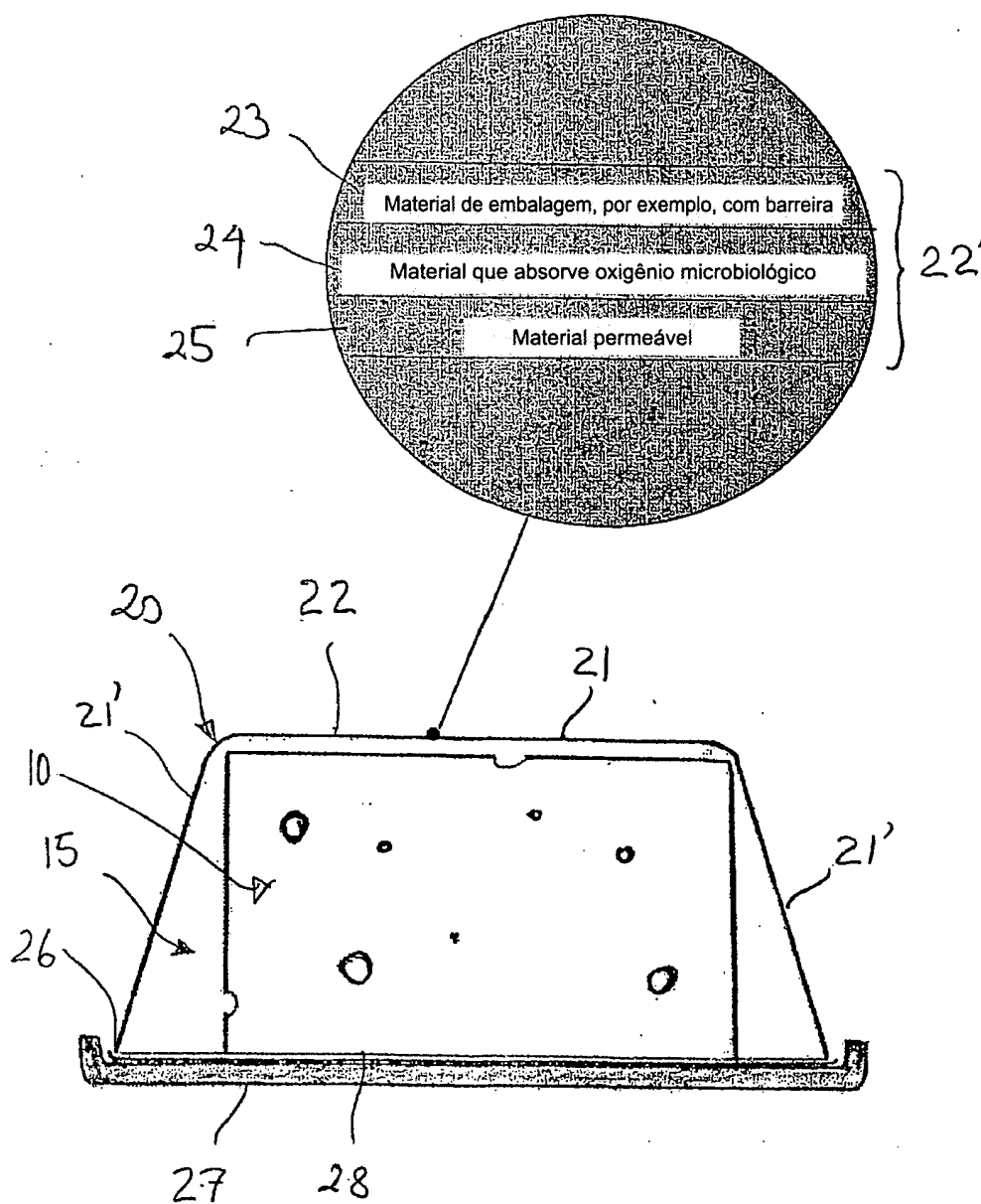


Fig. 1b

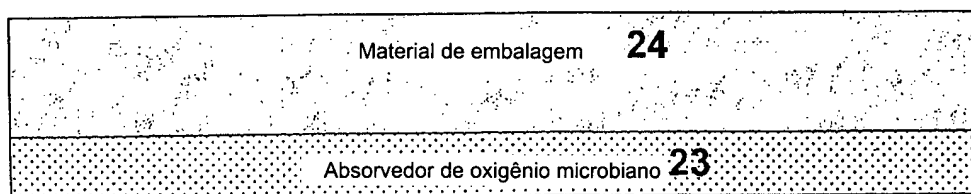


Fig. 1c

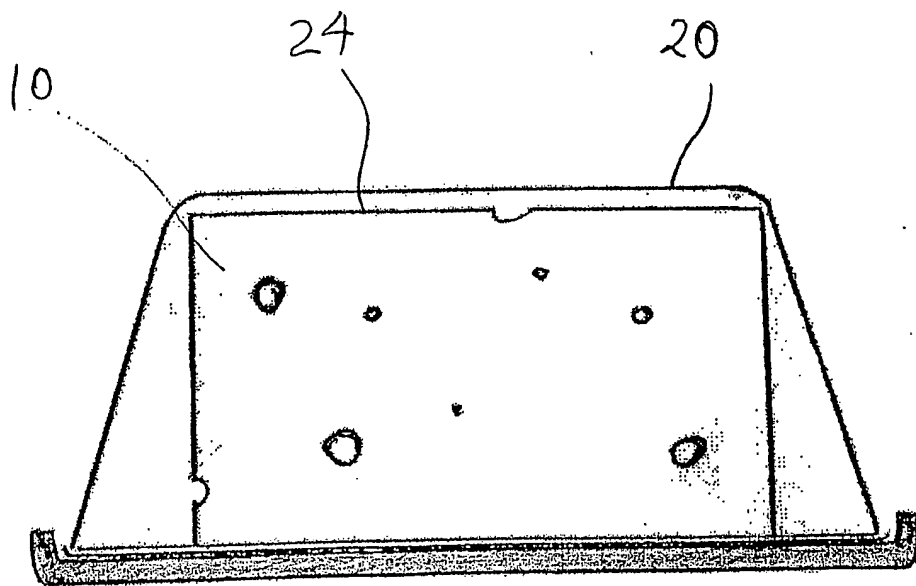


Fig. 2

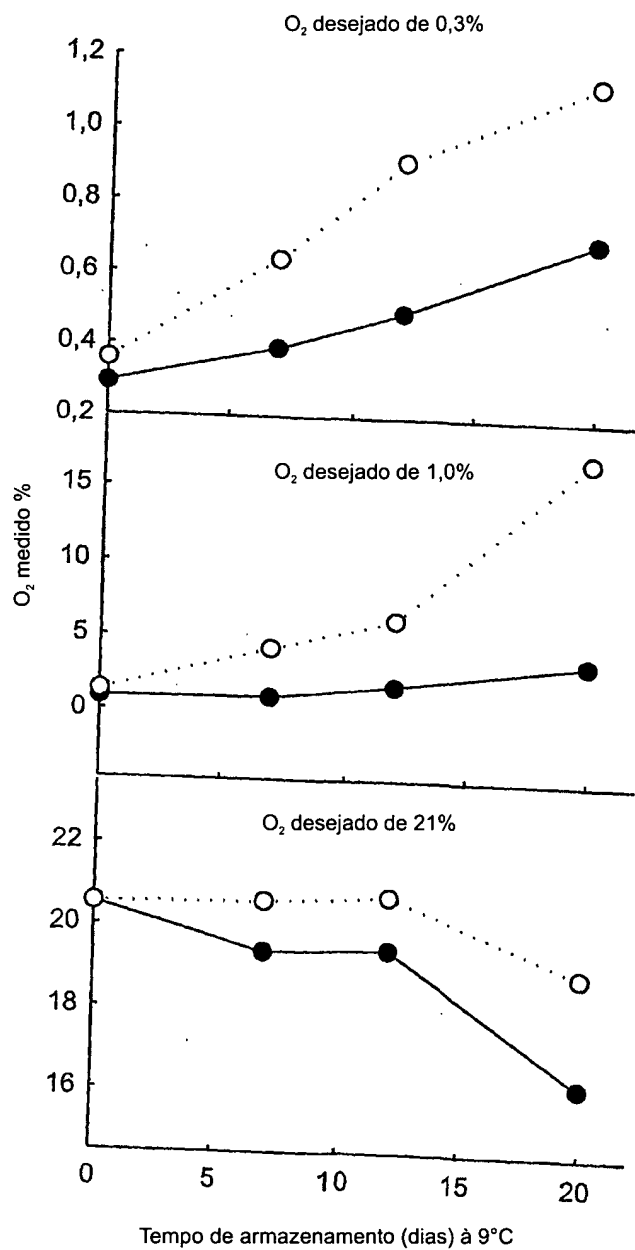
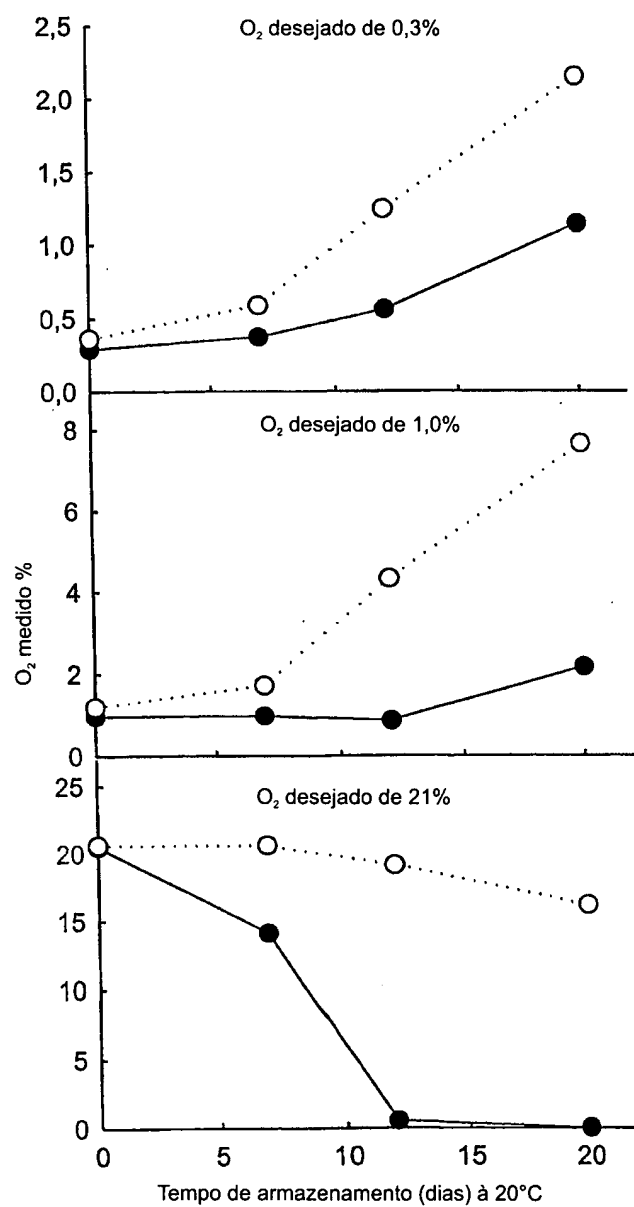


Fig. 3



RESUMO

Patente de Invenção: "**ABSORVEDOR DE OXIGÊNIO MICROBIANO**"

A presente invenção refere-se a embalagem e método aperfeiçoados para prolongar a vida de útil e a qualidade de alimento embalado,
5 compreendendo o uso de um absorvedor de oxigênio microbiano.