



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00481

(22) Data de depozit: 07/08/2019

(41) Data publicării cererii:
26/02/2021 BOPI nr. 2/2021

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

(72) Inventatori:
• CONDURACHE NINA NICOLETA,
STR. LĂCĂTUȘILOR NR. 5, BL. R4, SC. 3,
ET. 2, AP. 61, GALAȚI, GL, RO;

• BAHIM GABRIELA ELENA,
STR.PORTULUI NR.45, BL.MUREȘ, SC.2,
ET.3, AP.33, GALAȚI, GL, RO;
• RĂPEANU GABRIELA, STR.BRĂILEI
NR.17, BL.R2, AP.53, GALAȚI, GL, RO;
• STÂNCIUC NICOLETA,
COMUNA TUDOR VLADIMIRESCU,
GALAȚI, GL, RO

(54) **INGREDIENTE NATURALE CU FUNCȚIONALITATE
MULTIPLĂ PE BAZĂ DE EXTRACTE ANTOCIANICE DIN COJI
DE VINETE ȘI BACTERII LACTICE CO-MICROÎNCAPSULATE
ȘI APLICAȚII ALE ACESTORA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor ingrediente funcționale pentru industria alimentară. Procedeu, conform invenției, constă în liofilizarea unui extract etanolic din coji de vinete, având conținut ridicat de compuși antocianici și bacterii lactice selecționate într-o combinație de matrici pe bază de proteine și

hidrolizate din zer, carboximetilceluloză și pectină, rezultând ingrediente naturale cu biocompatibilitate *in vitro*, având activitate antioxidantă și metabolică ridicată.

Revendicări: 2



Descrierea invenției

Prezenta invenție se încadrează în strategia implementată de Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor din cadrul Universității *Dunărea de Jos* din Galați, care vizează dezvoltarea unor tehnologii pentru obținerea de aditivi alimentari, valorificând beneficiile ingredientelor naturale, care încorporate în produse alimentare sau nutraceutice, să permită dezvoltarea de alimente cu funcționalitate ridicată, sănătoase. Astfel, se propune, ca prin rezultatele obținute prin prezenta cerere de brevet, să se contribuie la dezvoltarea pe termen lung a unei culturi nutriționale, atât prin contribuții la schimbarea viziunii producătorilor, dar și a consumatorilor, prin combinarea alimentației și a unui stil de viață sănătos, prin dezvoltarea și promovarea consumului de alimente sănătoase, ținând cont de preferințele consumatorilor și de obișnuințele lor, legate de viața activă, economisirea de timp, hedonism.

Prin urmare, obiectul prezentei invenții îl constituie realizarea și descrierea în detaliu a unor procedee de obținere și funcționalizare a unor ingrediente naturale obținute prin comicroîncapsularea prin liofilizare a unui extract antocianic din coji de vinete (*Solanum melongena* L.) împreună cu bacterii lactice, proteine și peptide din zer și substanțe suport precum, carboximetilceluloză și pectină.

Industria alimentară se confruntă în ultimii ani cu necesitatea înlocuirii aditivilor de sinteză chimică cu cei naturali, determinată de creșterea exigențelor consumatorilor, care își doresc alimente cât mai naturale, cu inocuitate ridicată, obținute pe principiul *fresh like*, mai sănătoase, cu potențiale efecte benefice asupra sănătății. Prin urmare, este evidentă nevoia de dezvoltare a unor ingrediente, care să prezinte funcționalități multiple, ca alternative naturale, atât pentru a îmbunătăți caracteristicile senzoriale (culoare, aromă, textură etc.) valoarea nutritivă, funcțiile tehnologice, dar care să ofere proprietăți biologice, cum ar fi activitatea antioxidantă, antimicrobiană, prebiotică și probiotică.

Carocho și colab. (2015) clasifică aditivii naturali în patru mari categorii, și anume: *antioxidanți naturali* (polifenolii, acidul ascorbic, carotenoidele și tocoferolii), *antimicrobieni naturali* (bacteriocine, natamicina, reuterina, poli-L-lizina, lizozimul, lactoperoxidaza, lactoferina, polifenolii și uleiurile esențiale), *coloranții naturali* (annato, paprika, carotenoidele, antocianii, betalainele, clorofilele, curcumina, acidul caminic) și *îndulcitorii naturali* (eritritol, tagatoza, steviol glicozide, taumatina, glicirizina). Ingredientele formulate în cadrul acestei invenții pot fi clasificate în categoria antioxidantilor și pigmentilor naturali, dar prin includerea bacteriilor lactice și a polifenolilor se pot anticipa și proprietăți fiziologice importante (acțiune antimicrobiană, rol prebiotic și probiotic).

Polifenolii reprezintă unii dintre cei mai studiați compuși naturali din regnul vegetal, datorită în principal activității antioxidante, cu efecte importante asupra sănătății umane, și anume activitate anticancerigenă, combat osteoporoza, cataracta, disfuncțiile cardiovasculare, bolile de imunitate etc (Carocho & Ferreira, 2013). Există numeroase studii care susțin necesitatea unui aport de circa 1 g polifenoli/zi. Acest aport poate fi îmbunătățit și prin dezvoltarea de alimente cu valoare adăugată, care în mod normal nu conțin polifenoli, dar care pot exploata potențialul pozitiv al acestora prin aditivarea unor ingrediente, valorificând

totodată o serie de subproduse rezultate de la prelucrarea materiilor prime de origine vegetală, care conțin în compoziția lor o cantitatea mare de compuși naturali cu valoare nutritivă și funcțională.

Antocianii conferă o mare diversitate de culori florilor, fructelor, frunzelor și tulpinilor, acoperind practic tot spectrul vizibil de culori, de la portocaliu și roșu, trecând prin nuanțe de violet și albastru. Diferențele de culoare induse de prezența antocianilor sunt determinate de numărul de grupări hidroxilice, gradul de metilare al acestor grupări, tipul, numărul și locul de legare a moleculei de glucid, precum și tipul și numărul acizilor alifatici sau aromatici atașați glucidului, dar și pH-ul mediului în care se află (Dugo și colab. 2001). Consumul regulat de antociani și alți polifenoli din fructe, legume, vinuri, gemuri și conserve este asociat și reducerea riscurilor apariției bolilor cronice. Lee și colab. (2009) sugerează faptul că antocianii sunt pigmenți cu o gamă largă de activități biologice cum ar fi: activitate antioxidantă (Tsuda și colab., 2003), antiinflamatoare (Wang și Mazza, 2002), anticancerigenă (Hou, 2003), antimutagenă (Peterson și Dwyer, 1998), activități chemoprotective și inhibarea activității α -glucosidazei.

Producția de **vinete** este importantă, cu valori de 50,19 milioane de tone, la nivel mondial, în anul 2014, China fiind principalul producător (29,5 milioane de tone), urmată de India (13,5 milioane de tone), Egipt (1,2 milioane de tone), Iran (0,85 milioane de tone) și Turcia (0,82 milioane de tone) (FAO, 2014). Vinetele sunt caracterizate de un conținut ridicat de compuși polifenolici cu proprietăți antioxidante. Cao și colab. (1996) clasifică vinetele printre primele zece legume cu activitate antioxidantă ridicată. În plus, vinetele se remarcă pentru conținutul de flavonoide din coaja, care conțin cantități mari de **nasunină** (Koponen și colab., 2007) și, de asemenea, sunt recunoscute pentru concentrațiile ridicate de acizi fenolici în pulpă, în special acid clorogenic (Whitaker și Stommel, 2003). Procesarea la scară industrială determină obținerea unor cantități semnificative de coji de vinete, bogate în compuși antocianici, care necesită dezvoltarea de tehnologii de procesare și valorificare, atât pentru protecția mediului înconjurător, cât și pentru valorificarea compușilor naturali, bioactivi.

Bacterii lactice sunt consumate de mii de ani, efectele lor pentru sănătate fiind binecunoscute, mai ales prin consumul de produse fermentate de origine vegetală și animală. Beneficiile bacteriilor lactice sunt multiple, atât *in vitro*, cât și *in vivo*. În produsele alimentare fermentate lactic, speciile *Lactobacillus plantarum* și *Lactobacillus bifementans* sunt cunoscute pentru faptul că sintetizează o serie de compuși cu acțiune antioxidantă și antimicrobiană (acizi organici, peptide, substanțe cu masă moleculară mică etc.). Totodată, aceste specii de bacterii au o rezistență mai crescută față de alte specii, dezvoltându-se facil în sisteme alimentare, în prezența sării sau a altor aditivi (Teneva-Angelova și colab., 2018). *In vivo*, Choi și Chang (2015) au demonstrat efectul de reducere al colesterolului, prin consumul de produse fermentate utilizând tulpini de *Lactobacillus plantarum*. Lee și colab. (2016) au demonstrat efectele acestor produse împotriva celulelor canceroase prin inducerea apoptozei. Diferite studii au demonstrat faptul că numărul de bacterii viabile care ajung în intestin este cu mult mai mic față de numărul de bacterii ingerate (Coelho-Rocha și colab., 2018). Din acest motiv, încapsularea este o metoda recomandată de creștere a biodisponibilității bacteriilor lactice.

Proteinele din zer sunt reprezentate de un amestec de proteine globulare, izolate din zerul rezultat de la fabricarea brânzeturilor. Capacitatea proteinelor din zer de a forma geluri și microcapsule fără utilizarea unui tratament termic sever sau a unor adjuvanți pentru microîncapsulare, le transformă în materiale ideale pentru dezvoltarea unor sisteme de livrare controlată a unor compuși biologic activi, dar și un transportor eficient pentru micoorganisme probiotice (Krunić și colab., 2018). În plus, proteinele din zer prezintă numeroase funcții biologice, la nivelul sistemului cardiovascular, digestiv, endocrin, imunitar și sistemului nervos. Adesea, proteinele din zer sunt descrise ca *proteine perfecte din punct de vedere nutrițional*, deoarece conțin toți aminoacizii esențiali și neesențiali necesari organismului uman. Datorită particularităților structurale, date în special de structura globulară, multe din proprietățile bioactive ale proteinelor din zer sunt criptate în secvențele lor native și astfel pot fi eliberate numai prin fragmentarea lanțului polipeptidic, de exemplu, prin hidroliza enzimatică (Pihlanto-Leppälä, 2000). Peptidele rezultate din hidroliza enzimatică a proteinelor din zer sunt recunoscute pentru activitatea lor biologică și funcțională excepțională, cum ar fi efecte benefice asupra sistemului imunitar, cardiovascular, nervos și gastrointestinal.

Încapsularea este o tehnică consacrată pentru îmbunătățirea stabilității celulelor și pentru protecția compușilor biologic activi și a produselor derivate. Încapsularea bacteriilor lactice aduce numeroase beneficii, cum ar fi de exemplu: celulele microîncapsulate sunt protejate de factorii externi și au o capacitate mai mare de supraviețuire în timp și la condiții de depozitare diferite și, de asemenea, bacteriile au capacitatea de a supraviețui *in vivo*, în condiții de pH scăzut, prezenței enzimelor digestive și a sărurilor biliare etc. (Krunić și colab., 2016).

În literatura de specialitate au fost identificate o serie de brevete de invenție care valorifică potențialul nutrițional și funcțional al antocianilor și bacteriilor lactice, după cum urmează:

Patent 8491670/2013 Anthocyanin pigment/dye compositions and method of providing composition through extraction from corn, inventatori Regina Celia Bertoldo de Barros, Michele Ann French, Frederic John Rigelhof, Lee Kent French, reprezintă o metodă brevetată de extracție a pigmentilor antocianici din boabe de porumb într-un mediu apos. Boabele de porumb conțin 0,1 mg de antociani pe gram. Soluția apoasă este omogenizată la temperaturi mai mari de 35°C, după care partea solidă se separă cu obținerea unui mediu apos care conține circa 1,0% antociani. Extractul este apoi concentrat și purificat.

Patent 217/2171672 The way to obtain microencapsulated forms of lactobacilli, se referă la variante tehnologice care includ culturi de celule bacteriene, microencapsulate într-o matrice de copolimeri de acizi acrilici și metacrilici în suspensie apoasă. Aceste culturi liofilizate au fost obținute prin dispersia culturilor de celule vii în suspensia apoasă de copolimer, suspensia obținută este injectată în parafină lichidă, uleiuri minerale, și uleiuri esențiale conținând 0,1 până la 0,5% stearat de aluminiu și 3 - 7% PEG 400, cu omogenizare continuă la 100 - 300 rpm, înainte de formarea microcapsulelor. Ca bacterii, s-au utilizat tulpinile de *Lactobacillus fermentum* 90-TS-4 sau VKM B-7573.

Patent 20140370107/2014, *Multilayer microencapsulated probiotic bacteria*, inventatori Giovanni Mogna, Luca Mogna, se referă la un procedeu pentru prepararea bacteriilor lactice și a bifidobacteriilor microcapsulate în multistrat, cu activitate probiotică. Obiectul acestei invenții se referă la utilizarea bacteriilor microcapsulate pentru a obține un produs finit (produs alimentar, dispozitiv medical sau suplimentar alimentar), cum ar fi: lapte, lapte integral, lapte parțial degresat, lapte praf sau congelat, brânză, brânză maturată, unt, margarină, iaurt, smântână, creme pe bază de lapte și ciocolată, creme pentru dulciuri, gemuri și suspensii uleioase.

Bacteriile probiotice utilizate în microcapsule sunt: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. paracasei*, group *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. pseudocatenulatum* și *S. thermophilus*.

Patent EP2603208A2/2011, *Process of manufacturing a stable softgel capsule containing microencapsulated probiotic bacteria*, inventatori Claudia Valla, Rosa Bertolami, Giovanni Rosina, Karen Helson, descrie un proces de obținere a unui gel care conține bacterii probiotice microîncapsulate, stabil la temperatura camerei timp de 24 de luni.

Patent 127476/2014, *Stabilized anthocyanin food colorant*, inventatori Wayne H. Crosby, Charles V. Fulger, Gerhard J. Haas, Donna M. Nesheiwat, descrie un proces de obținere a unui colorant din tescovina de struguri roșii, printr-un proces de extracție etanolică la temperatura de 30°C, adăugarea de acid tanic, recuperarea compușilor antocianici, printr-un proces de uscare în două etape, incluzând evaporarea urmată de uscare prin pulverizare în prezența dextrinei.

Față de cele prezentate mai sus, invenția propusă se individualizează prin co-microîncapsularea prin liofilizare a unui extract antocianic din coji de vinete (*Solanum melongena* L.), împreună cu bacterii lactice, în materiale complexe formate din carboximetilceluloză, pectină, proteine și peptide din zer, care să asigure protejarea compușilor biologic activi de efectele de degradare induse de condițiile de procesare, cum ar fi: regimul termic, lumina, oxigenul, pH-ul, etc. De asemenea, co-microîncapsularea a urmărit obținerea unor pudre cu stabilitate ridicată în timp, în ceea ce privește conținutul în compuși biologic activi și viabilitatea bacteriilor lactice, cu proprietăți multifuncționale superioare, ușor de manipulat și depozitat.

Parametrii invenției

1. Obținerea extractului din coji de vinete liofilizate

Extractul din coji de vinete s-a obținut prin extracție convențională, utilizând 20 g de coji de vinete liofilizate și 180 mL de amestec de extracție, formată din etanol și acid citric (96%), în raport de 9:1, timp de 30 de minute de extracție, cu omogenizare la 150 rpm. În urma extracției repetate (2 extracții) și concentrarea extractului sub vid, s-au obținut 6 g de extract

concentrat, acesta fiind mai apoi caracterizat în ceea ce privește conținutul de antociani monomerici, flavonoide totale, polifenoli totali și activitate antioxidantă.

2. Obținerea hidrolizatelor proteice

Substratul 5% β -lactoglobulină, în 50 mM soluție tampon Tris-HCl cu 20 mM CaCl_2 , pH 8,0, după hidratare timp de 1 oră, la temperatura de 40°C, a fost supus hidrolizei enzimatică cu termolizină (EC 3.4.24.27, Sigma Aldrich, Germania, tip X, activitate enzimatică 30-175 unități/mg proteină), în raport enzimă:substrat de 1:50, în condiții optime de hidroliză specifice enzimei utilizate (pH 8,0, temperatură 37°C, timp de două ore), până la un grad de hidroliză de 21%. După hidroliză, enzima a fost inactivată prin tratament termic la temperatura de 95°C, timp de 15 min. Hidrolizatele proteice rezultate au fost păstrate la temperatura de -20°C până la utilizare în formulele de comicroîncapsulare.

3. Obținerea inoculului de bacterii lactice

Culturile stoc de bacterii lactice, *Lactobacillus bif fermentans* și *Lactobacillus plantarum*, conservate în stare congelată, în 40% glicerol, la temperatura de -75°C, sunt în gestiunea Colecției de microorganisme, cu indicativul MIUG, a Platformei Bioaliment, din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, din cadrul Universității „Dunărea de Jos” din Galați, România. Încadrarea taxonomică a culturilor s-a realizat folosind MicroLog M System (Biolog, USA). Pentru utilizare, în prima etapă s-a obținut un preinocul prin cultivare în mediul Man Rogosa și Sharpe (MRS lichid), la temperatura de 37°C, timp de 24 de ore, în sistem staționar, în condiții de aerobioză. Un volum de 2% preinocul (cca. 1,8 densitatea optică a suspensiei, măsurată la lungimea de undă de 600 nm), s-a inoculat în mediul MRS lichid și s-a continuat cultivarea timp de 48 de ore, la temperatura de 37°C, în sistem staționar, în condiții de aerobioză. La sfârșitul cultivării, biomasa de celule s-a separat prin centrifugare la 9000 rpm, timp de 15 minute, la 4°C. Biomasa separată s-a suspendat în 20 mL de soluție sterilă 0,9% NaCl (ser fiziologic), iar apoi s-a recentrifugat, operația de spălare repetându-se de trei ori. O cantitate de 1 g de biomasă umedă s-a resuspendat apoi în 20 mL de apă utrapură, iar suspensia obținută a fost utilizată pentru co-microîncapsulare. Suspensia de bacterii lactice s-a utilizat în 2 variante, o singură cultură (*L. bif fermentans*) sau în culturi combinate (*L. bif fermentans*, *L. plantarum*), în proporție de 1:1.

4. Procesul tehnologic de obținere a ingredientelor naturale funcționalizate

Pentru co-microîncapsularea extractului antocianic și a bacteriilor lactice, s-a utilizat liofilizarea ca tehnică principală și izolat proteic din zer, hidrolizate proteice din zer, pectină și carboximetilceluloză, ca materiale de încapsulare și suspensia de bacterii lactice, în trei variante de lucru, prezentate în **Figurile 1-3**.

6 g de extract au fost solubilizate în 300 mL apă utrapură, obținându-se o concentrație finală de 20 mg/mL. Pentru fiecare variantă de co-microîncapsulare, s-au utilizat câte 60 mL de extract în care s-au solubilizat 1,2 g izolat proteic din zer, 1% carboximetilceluloză și 0,5 % pectină, la final adăugându-se și 10 mL hidrolizat proteic. Probele au fost menținute pentru hidratare timp de 2 ore cu agitare la 450 rpm la temperatura de 40°C. Sterilizarea s-a realizat

utilizând tehnica UV timp de 1 oră, apoi s-a adăugat 20 mL de suspensie de bacterii lactice, conform datelor și codificării din **Tabelul 1**.

Tabel 1. Denumirea și codificarea probelor și suspensiile de bacterii lactice utilizate pentru co-microîncapsulare

Codificarea probei	Descrierea probei
VM	20 mL apă ultrapură sterilă
V1	20 mL suspensie <i>Lactobacillus bif fermentans</i>
V2	20 mL suspensie <i>Lactobacillus bif fermentans</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i> (1:1)

5. Evaluarea numărului de bacterii lactice

Determinarea viabilității bacteriilor s-a realizat prin tehnica de numărare indirectă, prin cultivare în mediul MRS cu agar (Champagne și colab., 2011). Probele au fost diluate prin tehnica diluțiilor decimale, utilizând ca lichid de diluare ser fiziologic steril. Din ultimele trei diluții s-a prelevat câte 1 mL suspensie și s-a repartizat aseptice în câte două plăci Petri sterile, în paralel, pentru fiecare diluție. Peste suspensia din placă s-a adăugat câte 20 mL mediu de cultură MRS cu agar, conținând 0,1% carbonat de calciu, fluidificat și temperat la aproximativ 42°C. După omogenizarea și solidificarea mediului în plăci, acestea s-au termostatat la temperatura de 37°C, timp de 48 de ore. Numărul de unități formatoare de colonii (ufc)/g probă s-a stabilit în corelație cu numărul de colonii din plăcile selectate pentru numărare, corespunzătoare la două diluții succesive (plăcile conținând între 15 și 300 colonii), coloniile prezentând în jurul lor un halou incolor, comparativ cu restul mediului opac.

6. Testarea biocompatibilității *in vitro* a ingredientelor multifuncționale

Biocompatibilitatea *in vitro* a ingredientelor multifuncționale a fost evaluată prin testarea acestora pe celule fibroblaste, folosind linia celulară stabilizată NCTC clona L929, conform standardului internațional de testare a citotoxicității SR EN ISO 10993-5/2009. În acest context, s-au investigat viabilitatea celulară și proliferarea celulară (testul Rosu Neutru) și morfologia celulelor (colorație Giemsa) cultivate în prezența variantelor obținute. **Testarea ingredientelor multifuncționale în sisteme alimentare**

Cele patru variante experimentale au fost testate prin utilizare în sisteme alimentare, fiind selectată ca sistem model înghețata. Tehnologia de obținere presupune următoarele: amestecarea în condiții adecvate de igienă a componentelor: 20 g lapte condensat, 5 g ciocolata albă, 20 g frișcă vegetală, 2,5 g miere și 2 mL zeamă de lămâie. Pudrele multifuncționale au fost adăugate în concentrație de 2% față de amestecul rezultat.

- ☐ M – înghețată martor
- ☐ PM – înghețată cu 2% pudră în varianta codificată VM
- ☐ P1 – înghețată cu 2% pudră în varianta codificată V1
- ☐ P2 – înghețată cu 2% pudră în varianta codificată V2

7. Caracterizarea fitochimică și probiotică a ingredientelor co-microîncapsulate

Procesele tehnologice au fost realizate în 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 (<https://erris.gov.ro/FOOD-BIOTECHNOLOGY>).

Biocompatibilitatea ingredientelor multifuncționale a fost evaluată în cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe Biologice, București (<https://erris.gov.ro/INSTITUTUL-NATIONAL-DE-CERCE-16>).

Metodele utilizate pentru determinarea conținutului de compuși biologic activi sunt: metoda Folin-Ciocalteu pentru determinarea conținutului de polifenoli totali (mg acid galic (AG)/g S.U.) (Giusti și Wrolstad, 2001), metoda cu clorură de aluminiu (Dewanto și colab., 2002) pentru determinarea conținutului de flavonoide totale (mg echivalenți catehină (EC)/g), metoda AOAC (2005) pentru determinarea conținutului de antociani monomerici (mg delfinidin-3-glicozid (D3G)/g S.U.) și metoda reducerii radicalului 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) în prezența unui antioxidant (Yuan și al. 2013) pentru activitatea antioxidantă (mMol Trolox/g S.U.).

Experimente efectuate

Extractul din coji de vinete, ingredientele co-microîncapsulate funcționalizate și produsele testate au fost caracterizate fitochimic, în ceea ce privește conținutul de polifenoli totali, antociani, flavonoide totale, activitate antioxidantă și biocompatibilitate *in vitro*. Ingredientele funcționalizate și produsele testate au fost testate în plus și din punct de vedere microbiologic în ceea ce privește viabilitatea bacteriilor lactice. Profilul fitochimic și viabilitatea bacteriilor lactice au fost testate pe durata depozitării ingredientelor, la temperatura 4-6°C, timp de 30 zile. De asemenea, pentru a verifica stabilitatea ingredientelor în sistemele alimentare selectate, s-a testat profilul fitochimic și viabilitatea bacteriilor lactice pe o perioadă de depozitare, timp de 21 de zile de depozitare, la temperatura de -18°C.

1. Caracterizarea fitochimică a extractului din coji de vinete

În **Tabelul 2** este prezentat profilul fitochimic al extractului obținut din cojile de vinete.

Tabel 2. Caracteristicile fitochimice ale extractului antocianic din coji de vinete

Caracteristică	Valoare
Conținut de antociani monomerici (mg delfinidin-3-glicozid/g S.U.)	0,66 ±0,01
Conținut de flavonoide totale (mg echivalenți catehină/g S.U.)	15,11 ±0,14
Conținut de polifenoli totali (mg echivalenți acid galic/g S.U.)	24,15 ±0,34
Activitate antioxidantă (mMol Trolox/ S.U.)	258,04 ±0,51

Se poate observa din **Tabelul 2** că extractul antocianic din coji de vinete a prezentat un conținut ridicat de polifenoli și flavonoide, care au determinat obținerea unei activități antioxidante semnificative.

2. Caracterizarea fitochimică, funcțională și citotoxică a ingredientelor co-microîncapsulate

Ingredientele co-microîncapsulate funcționalizate obținute au fost testate pentru evaluarea caracteristicilor funcționale, rezultatele fiind prezentate în **Tabelul 3**.

Tabel 3. Caracteristicile funcționale ale ingredientelor formulate

Caracteristici fitochimice	VM	V1	V2
Eficiența încapsulării antocianilor (%)	95,76 ±0,67	94,85 ±0,38	95,89 ±0,18
Conținut de antociani monomerici (mg D3G/g S.U.)	0,36 ±0,01	0,27 ±0,005	0,32 ±0,01
Conținut de flavonoide totale (mg EC/g S.U.)	4,33 ±0,74	5,02 ±0,88	4,94 ±0,86
Conținut de polifenoli totali (mg AG/g S.U.)	4,77 ±0,26	5,88 ±0,72	6,34 ±0,70
Activitate antioxidantă (mMol Trolox/g S.U.)	86,55 ±0,66	73,77 ±0,50	85,25 ±0,89
Număr bacteriilor lactice (ufc/g S.U.)	-	4,91×10 ⁶	2,8×10 ⁶

Așa cum se poate observa din **Tabelul 3**, nu există diferențe semnificative în ceea ce privește profilul fitochimic și eficiența încapsulării antocianilor în cele 3 variante experimentale. Se poate aprecia că tehnica de co-microîncapsulare și compușii utilizați au permis obținerea unor variante de pudre cu un conținut ridicat de compuși biologic activi și bacterii lactice, cu o eficiență de încapsulare ridicată. Prin urmare, toate variantele au prezentat valori remarcabile ale activității antioxidante.

Pentru a susține multifuncționalitatea propusă pentru invenție, și anume activitatea antioxidantă ridicată și funcționalitatea bacteriilor lactice, ingredientele au fost testate pentru stabilitate la depozitare, timp de 30 de zile, la temperatura de 4-6°C, atât pentru profilul fitochimic cât și pentru viabilitatea bacteriilor lactice. Rezultatele sunt prezentate în **Tabelul 4**.

Tabel 4. Caracteristicile funcționale ale ingredientelor formulate după 30 de zile de depozitare, la temperatura de 4-6°C

Caracteristici fitochimice	VM	V1	V2
Conținut de antociani monomerici (mg D3G/g S.U.)	0,34±0,003	0,24±0,002	0,22±0,002
Conținut de flavonoide totale (mg EC/g S.U.)	2,60±0,08	4,51 ±0,07	2,28±0,12
Conținut de polifenoli totali (mg AG/g S.U.)	8,05±0,20	6,39 ±0,09	7,28±0,45
Activitate antioxidantă (mMol Trolox/g S.U.)	99,55±0,51	80,22±0,33	88,29±0,71
Viabilitatea bacteriilor lactice (ufc/g S.U.)	-	1,97×10 ⁶	2,5×10 ⁶

Depozitarea la temperaturi de 4-6°C, timp de 30 de zile, a determinat o scădere a conținutului de compuși biologic activi, în special în proba codificată V3, pentru conținutul de antociani monomerici (cu circa 32%), și pentru conținutul de flavonoide totale, în probele codificate VM și V2 (cu circa 40%, în proba codificată VM și 54%, în proba codificată V2).

Toate cele trei probe au prezentat o eliberare a compușilor polifenolici, ceea ce a condus la o creștere a activității antioxidante. Toate probele au păstrat o activitate antioxidantă, peste 80 mM Trolox/g S.U. În ambele variante cu bacterii lactice, acestea au prezentat o viabilitate de 100%. Rezultatele obținute la depozitarea controlată, timp de 30 de zile, în condiții de

refrigerare, sugerează că ingredientele co-microîncapsulate funcționalizate prezintă un potențial remarcabil pentru utilizare în sisteme alimentare, dar și pentru dezvoltarea de nutraceutice.

Rezultatele evaluării biocompatibilității *in vitro* (Tabele 5 și 6) au demonstrat că toate variantele realizate au fost biocompatibile deoarece, comparativ cu proba martor (celule în mediul de cultură, fără produse), celulele cultivate în prezența ingredientelor funcționalizate au prezentat valori ridicate ale viabilității și proliferării, iar morfologia lor în cultură a fost normală, caracteristică fenotipului celulelor fibroblaste.

Tabel 5. Viabilitatea celulelor fibroblaste L929 cultivate în prezența ingredientelor funcționalizate timp de 24 h, determinată prin metoda cu Rosu Neutru (% din cultura martor)

Concentrație / Proba	10	50	100	250
V1	92,37	94,87	96,30	90,58
V2	96,43	101,50	103,18	102,43
V3	107,16	108,78	109,16	111,69

Tabel 6. Viabilitatea celulelor fibroblaste L929 cultivate în prezența ingredientelor multifuncționale timp de 48 h, determinată prin metoda cu Rosu Neutru (% din cultura martor)

Concentrație / Proba	10	50	100	250
V1	110,25	108,85	107,06	103,66
V2	104,79	103,08	101,02	94,03
V3	92,17	94,06	92,78	93,41

Din Tabele 5 și 6, s-au putut observa și concluziona următoarele:

Proba codificată VM a fost biocompatibilă pe domeniul 10-250 $\mu\text{g/mL}$, atât după 24 ore, cât și 48 de ore de cultivare. Valorile de viabilitate celulară au fost semnificativ crescute față de martorul netratat, ajungând până la 110%, după 48 ore de cultivare.

Proba codificată V1 a fost biocompatibilă pe tot domeniul de concentrații testat, după 24 ore și 48 ore de cultivare. Valorile de viabilitate celulară au fost nesemnificativ crescute față de martorul netratat, ajungând până la 103%, după 24 ore de cultivare și la 104%, după 48 ore de cultivare.

Proba codificată V2 a fost biocompatibilă pe domeniul de concentrații 10-250 $\mu\text{g/mL}$, stimulând proliferarea celulară la concentrații de 50-250 $\mu\text{g/mL}$, atât după 24 ore de cultivare, dar și după 48 ore de cultivare. La aceste concentrații, valorile de viabilitate celulară au fost semnificativ mai mari comparativ cu martorul netratat, ajungând până la 112%, după 24 ore de cultivare, dar a scăzut sub 100%, după 48 ore de cultivare.

3. Testarea ingredientelor co-microîncapsulate funcționalizate în sistemul alimentar selectat

Cele trei variante experimentale de ingrediente co-microîncapsulate funcționalizate au fost adăugate, în proporție de 2% masă de mix înghețată pentru care s-au testat: profilul

fitochimic și viabilitatea bacteriilor lactice, inițial și în timpul depozitării, luând în considerare o perioadă de valabilitate medie de 21 de zile. Produsele realizate au fost depozitate în recipiente cu protecție UV la temperatura de -18°C . Produsele derivate au păstrat sistemul de codificare aferent ingredientelor, adăugându-se litera I pentru a se evita confuziile. Rezultatele obținute inițial și după 21 de zile de depozitare sunt prezentate în **Tabelele 7 și 8**.

Tabel 7. Caracteristicile fitochimice și funcționale ale produselor cu valoare adăugată

Caracteristică fitochimică	M	IV1	IV2	IV3
Conținut de antociani monomerici (mg D3G/g S.U.)	0	$0,04 \pm 0,001$	$0,02 \pm 0,001$	$0,04 \pm 0,003$
Conținut de polifenoli totali (mg AG/g S.U.)	0	$0,94 \pm 0,06$	$0,85 \pm 0,04$	$0,99 \pm 0,07$
Activitate antioxidantă (mMol Trolox/g S.U.)	$0,51 \pm 0,08$	$3,95 \pm 0,32$	$3,89 \pm 0,29$	$4,96 \pm 0,44$
Viabilitatea bacteriilor lactice (ufc/g S.U.)	-	-	$2,66 \times 10^6$	$2,25 \times 10^6$

Tabel 8. Caracteristicile funcționale ale produselor cu valoare adăugată, după 21 de zile de depozitare, la temperatura de -18°C

Caracteristică funcțională	M	IV1	IV2	IV3
Conținut de antociani monomerici (mg D3G/g S.U.)	0	$0,08 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,003$	$0,08 \pm 0,001$
Conținut de polifenoli totali (mg AG/g S.U.)	0	$2,13 \pm 0,09$	$1,39 \pm 0,05$	$2,07 \pm 0,08$
Activitate antioxidantă (mMol Trolox/g S.U.)	$0,49 \pm 0,04$	$6,67 \pm 0,24$	$8,31 \pm 0,79$	$9,24 \pm 0,42$
Viabilitatea bacteriilor lactice (ufc/g S.U.)	-	-	$2,45 \times 10^6$	$8,9 \times 10^5$

Din **Tabelul 7**, se remarcă faptul că toate probele au prezentat valori asemănătoare pentru activitatea antioxidantă, în jur de 4 mMol Trolox/g S.U., semnificativ mai mare comparativ cu proba martor, cu o valoare spre 5 mMol Trolox/g S.U. pentru varianta codificată V3. Varianta tehnologică de înghețată funcționalizată cu *L.bif fermentans* a prezentat o concentrație de bacterii de ordinul 6 log/g produs.

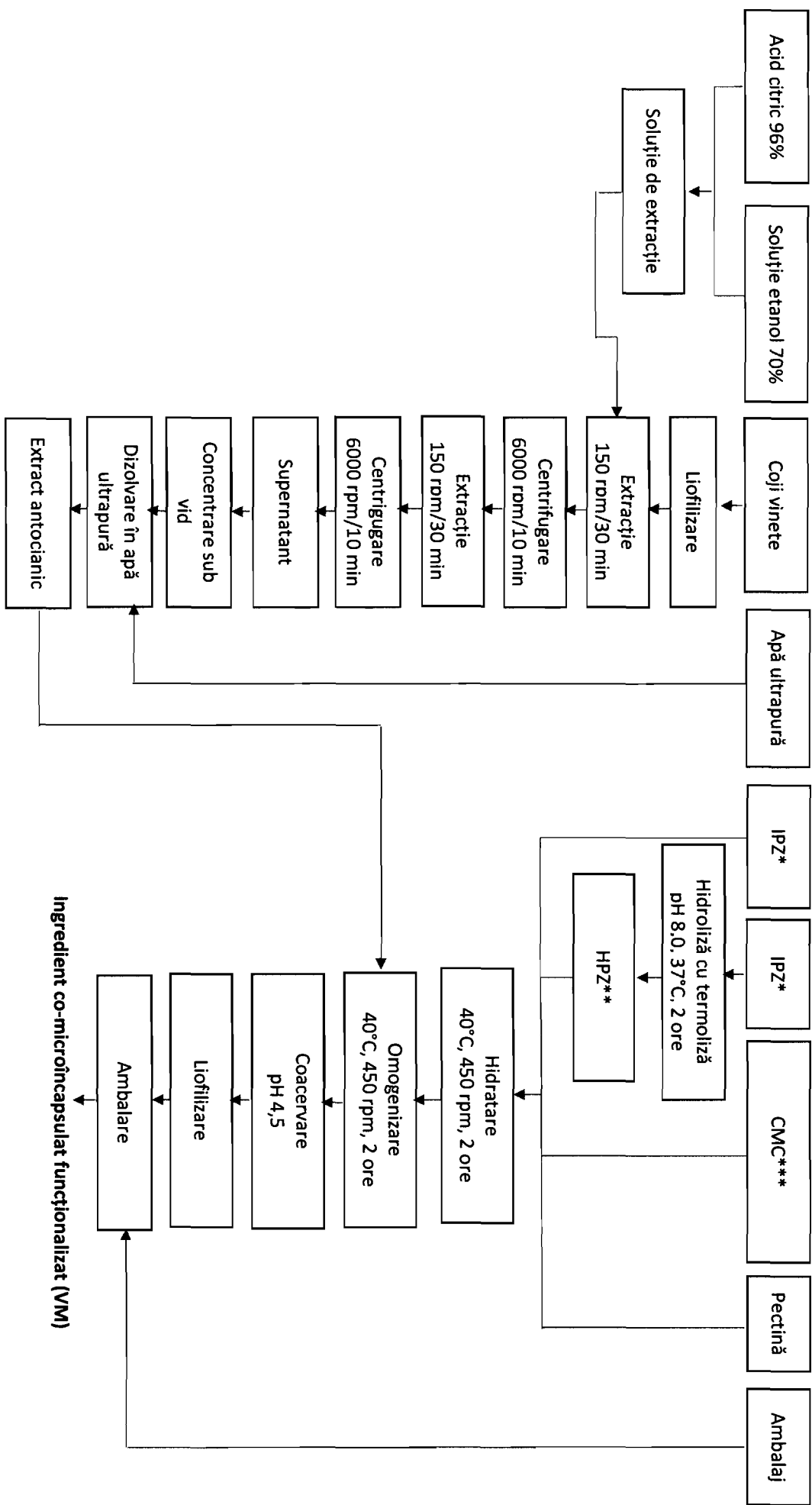
Depozitarea în condiții de congelare, specifică matricei selectate a condus la o eliberare semnificativă a compușilor biologic activi din co-microcapsule, ceea ce a condus la dublarea activității antioxidante pentru toate cele trei variante. Bacteriile lactice și-au păstrat viabilitatea la depozitare, cu o scădere de 1 log/g produs pentru varianta de în care s-au utilizat suspensii ale ambelor specii de lactobacili.

Pe baza experimentelor și rezultatelor obținute, se poate aprecia că procesul de co-microîncapsulare a fost eficient în protejarea compușilor biologic activi și a bacteriilor lactice, fapt care a condus la obținerea unor valori remarcabile pentru activitatea antioxidantă și menținerea viabilității bacteriilor lactice, atât în ingredientele formulate, cât și în matricea alimentară selectată, după o perioadă de păstrare de 30 de zile de păstrare, la temperaturi de $4-6^{\circ}\text{C}$ pentru ingredientele funcționalizate și respectiv 21 de zile de păstrare, la temperatura de -18°C , pentru produsele cu valoare adăugată (înghețată).

Concluzii

Rezultatele obținute în prezenta propunere de invenție susțin multifuncționalitatea ingredientelor co-microîncapsulate, obținute prin liofilizarea extractului etanolic din coji de vinete, bogat în compuși antocianici și bacterii lactice selecționate, într-o combinație de matrici de co-microîncapsulare, care exploatează potențialul biologic, funcțional și tehnologic al proteinelor din zer, peptidelor, carboximetilcelulozei și pectinei. Ingredientele obținute au prezentat valori ridicate ale eficienței de încapsulare, atât pentru compușii antocianici cât și pentru bacteriile lactice, demonstrându-se funcționalizarea prin activitatea antioxidantă și metabolică a bacteriilor lactice. Ingredientele au prezentat biocompatibilitate *in vitro*, toate cele trei variante prezentând valori acceptabile ale viabilității și proliferării celulelor fibroblaste.

Ingredientele funcționalizate propuse reprezintă o alternativă viabilă la variantele de antioxidanți de sinteză și pot avea destinații multiple, cum ar fi industria alimentară, nutraceutice, industria farmaceutică sau cosmeceutică. Ingredientele multifuncționale au prezentat o bună stabilitate în sisteme alimentare, utilizarea acestora nefiind limitată de matrice. Totuși, pe baza experimentelor efectuate, autorii invenției propun adăugarea ingredientului multifuncțional în produse cu pH ușor acid (mai mic de 5,0), care să asigure o stabilitate ridicată a bacteriilor lactice, cum ar fi: iaurturi și produse lactate fermentate, înghețată, creme pentru prăjituri etc. Autorii propun adăugarea ingredientelor multifuncționale în concentrație cuprinsă între 1 și 5%.



*IPZ – izolat proteic din zer. **HPZ – hidrolizat proteic din zer. ***CMC - Carboximetilceluloză
Figura 1. Schema bloc de obținere a ingredientului co-microincapsulat funcționalizat pe bază de extract din coji de vinete, proteine și hidrolizate proteice din zer, carboximetilceluloză și pectină (VM)

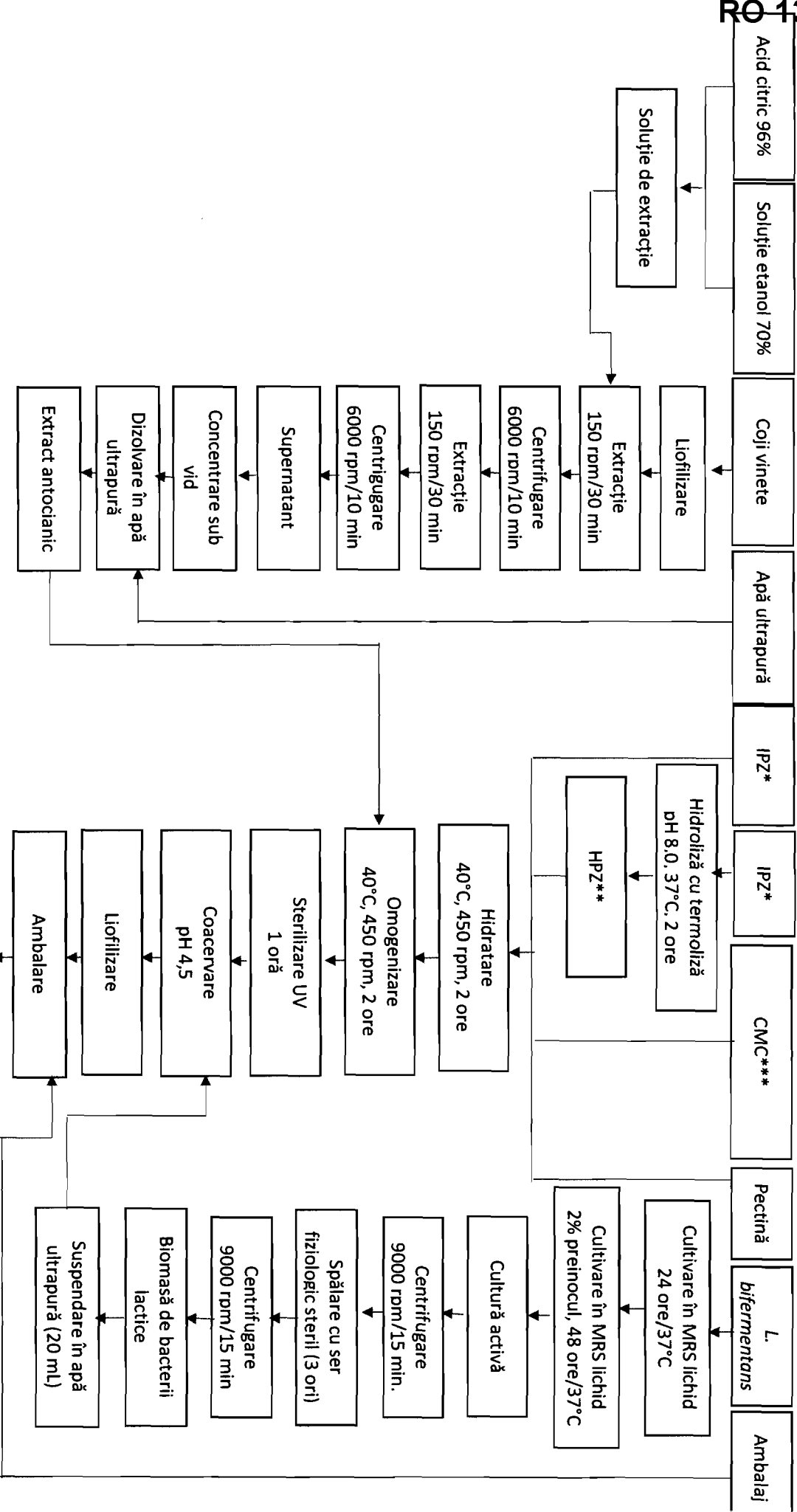
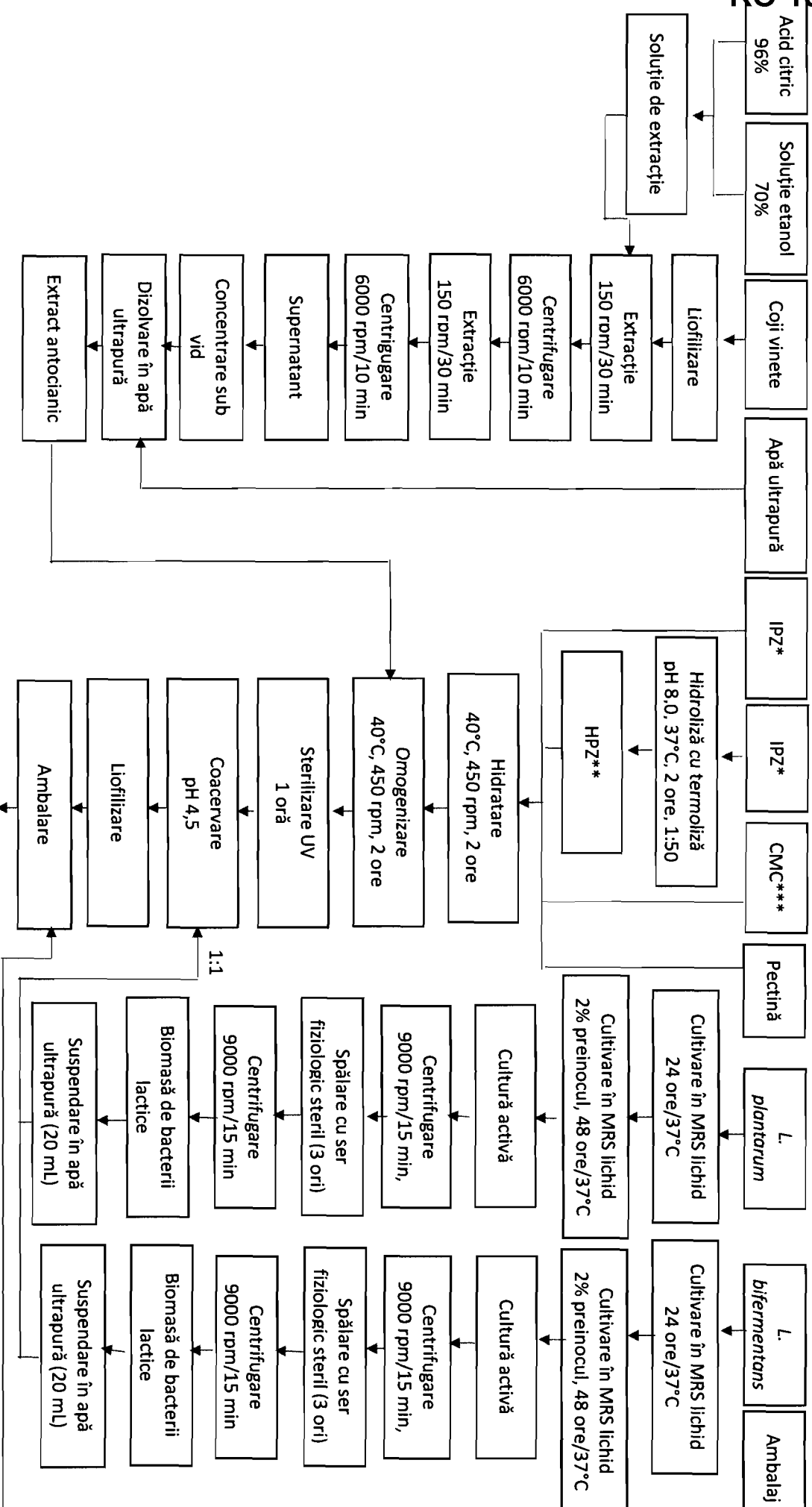


Figura 2. Schema bloc de obținere a ingredientului co-microcapsulat funcționalizat pe bază de extract din coji de vinete, proteine și hidrolizate proteice din zer, carboxime aluloză, pectină și biomasă de *Lactobacillus biferm ns* (V1)



Ingredient co-microcapsulat funcționalizat cu biomasă de *L. bifementans* și *L. plantarum* (V2)

Figura 2. Schema bloc de obținere a ingredientului co-microcapsulat funcționalizat pe bază de extract din coji de vinete, proteine și hidrolizate proteice din zer, carboximetilcelulă pectină și biomasă de *Lactobacillus bifementans* și *plantarum* (V2)

Referințe

- AOAC (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Edn.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 3426–3431.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). The role of phenolic compounds in the fight against cancer - A review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **13**, 1236-1258.
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, **45**, 284-295.
- Champagne, C.P., Ross, R.P., Saarela, M., Hansen, K.F., Charalampopoulos D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology* **149**, 185-193.
- Choi, E.A., Chang, H.C. (2015). Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kinchi. *LWT* **62** (1), 210-217.
- Coelho-Rocha, N.D., de Castro, C.P., de Jesus L.C.L., Leclercq, S.Y., de Cicco Sandes, S.H., Nunes, A.C., Azevedo, V., Drumond, M.M., Mancha-Agresti, P. (2018). Microencapsulation of lactic acid bacteria improves the gastrointestinal delivery and in situ expression of recombinant fluorescent protein. *Frontiers in Microbiology* **9**, 1-11.
- Dewanto, V, Wu, X, Adom, KK, Liu, RH. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 3010-3014.
- Dugo, P., L. Mondello, G. Errante, G., Zappia & G. Dugo. (2001). Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore high-performance liquid chromatography with electrospray ionization detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**(8), 3987-3992.
- Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO), Statistics Division, 2014. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Giusti, M.M., Wrolstad, RE. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, RE, Acree, TE, An, H, Decker, E., Penner, MH, Reid, DS, Schwartz, SJ, Schoemaker, CE, Sporns, P (Eds.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley&Sons, New York, NY, pp. 1-13.
- Hou, D.X., Yanagita, T., Uto, T., Masuzaki, S., Fujii, M. (2005). Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochemical Pharmacology*, **70**(3), 417–425.
- Koponen, J.M., Happonen, A.M., Mattila, P.J., Törrönen, A.R. (2007). Content of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 1612–1619.
- Kronic, T. Z., Bulatovic, M. L., Obradovic, N. S., Vukasinovic-Sekulic, M. S., Rakin, M. B. (2016). Effect of immobilisation materials on viability and fermentation activity of dairy starter culture in whey-based substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **96**, 1723–1729
- Kronic, T., Rakin, M., Bulatovic, M., Zaric, D. (2018). The contribution of bioactive peptides of whey to quality of food products. In A. M. Grumezescu and A. M. Holban (Eds.), *Food Processing for Increased Quality and Consumption* (pp 251-285), Elsevier Inc.

- Lee, J. H., N. S. Kang, S. O. Shin, S. H. Shin, S. G. Lim, D. Y. Suh, I. Y. Baek, K. Y. Park & T. J. Ha (2009). Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. *Food Chemistry*, **112**(1), 226-231
- Lee, K.H., Bong, Y.J., Lee, H.A., Kim, H.Y., Park, K.Y. (2016). Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from kimchi. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* **45** (1), 12–19.
- Peterson, J. & J. Dwyer (1998). Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, **18**(12), 1995-2018.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science & Technology*, **11**(9), 347–356.
- Teneva-Angelova, T., Hristova, I., Pavlov, A., Beshkova, D., Advances in Biotechnology for Food Industry, Chapter 4, 91-133, Editors Holban, A.M., Grumezescu A.M., Academic Press.
- Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki H., & Osawa, T. (2003). Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *Journal of Nutrition*, **133**(7), 2125-2130.
- Wang, J. & Mazza, G. (2002). Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**(15), 4183-4189.
- Whitaker, B.D., Stommel, J.R. (2003). Distribution of hydroxycinnamic acids in fruit of commercial eggplant (*Solanum melongena* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 3448–3454.
- Yuan, C, Du, L, Jin, Z, Xu, X. (2013). Storage stability and antioxidant activity of complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Carbohydrates Polymers*, **91**, 385-389.

Revendicări

Invenția cuprinde 2 revendicări:

1. Revendicare independentă

Ingrediente co-microîncapsulate funcționalizate prin utilizarea extractelor antocianice din coajă de vinete (*Solanum melongena* L.), bacterii lactice selecționate, proteine și peptide din zer, caracterizate prin aceea că sunt obținute printr-un procedeu de co-microîncapsulare prin liofilizare, și se prezintă sunt formă de pudre fine, de culoare mov închis și oferă produselor în care sunt adăugate culoare, activitate antioxidantă și metabolică.

2. Revendicare dependentă

Înghețată cu valoare adăugată prin utilizarea ingredientelor co-microîncapsulate funcționalizate pe bază de extracte antocianice din coajă de vinete (*Solanum melongena* L.), bacterii lactice selecționate, proteine și peptide din zer cu funcționalitate ridicată, caracterizate prin aceea că se prezintă sunt formă de produse cremoase, congelate, de culoare mov deschis, cu proprietăți funcționale, în special activitate antioxidantă și bacterii lactice vii.