



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00631**

(22) Data de depozit: **02/09/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/01/2021** BOPI nr. 1/2021

(41) Data publicării cererii:
30/03/2017 BOPI nr. 3/2017

(73) Titular:
• **MAGICNUC S.R.L.**,
STR. GENERAL CONSTANTINIDE NR. 1,
BL. 24C, SC. C, ET. 2, AP. 52, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **ȚULUCA ELISAVETA-VALERIA**,
STR. FRAȚII FĂGĂRĂȘANU NR. 38,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• **SERBĂNESCU OCTAVIAN**,
STR. IZVORUL OLTULUI NR. 2, BL. 25,
SC. A, ET. 3, AP. 12, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;

• **VASILESCU-PANEA GELU**,
CALEA CRÂNGAȘI NR. 10, BL. 19A, ET. 1,
AP. 2, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **TĂNĂSESCU DUMITRU-DAN**,
STR. GENERAL CONSTANTINIDE NR. 1,
BL. 24C, SC. C, ET. 2, AP. 52, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
CN 104719609 A; CN 102936610 B;
CN 1398909 A; CN 104222478 A
CN 104719609 A; CN 102936610 B;
CN 1398909 A; CN 104222478 A

(54) **PROCEDEU INTEGRAT DE DISPONIBILIZARE
A PROTEINELOR ȘI A ANTIOXIDANȚILOR HIDROFILICI
DIN SUBPRODUSE NUCIFERE**



RO 131711 B1

1 Invenția se referă la un procedeu integrat de disponibilizare nutraceutică a compușilor naturali remanenți în miezul de nucă delipidizat, prin presarea la rece a uleiului.

3 Sunt cunoscute din literatura brevet următoarele metode ce utilizează șrotul de nucă în diverse scopuri.

5 **CN 104719609 A** se referă la o metodă de obținere a concentratului proteic din nuci. Această metodă presupune utilizarea ca materie primă a șrotului de nucă și este caracterizată de ultrasonicarea amestecului de concentrat proteic nucifer cu apă deionizată și extracția etanolică.

9 **CN 102936610 B** descrie o metodă eficientă de extracție a proteinelor din șrotul de nucă, care este mărunțit la o dimensiune de 100 mesh și care ulterior este supus extracției enzimatică în vederea obținerii unui produs proteic nucifer cu un conținut de proteină de 47,85%.

13 **CN 1398909 A** prezintă un procedeu tehnologic de delipidizare a șrotului de nucă pentru obținerea extractului proteic. Procedeul include etapa de extracție a lipidelor cu eter dietilic timp de 2 h, separarea concentratului proteic prin centrifugare, măcinarea reziduului la dimensiunea de 80 mesh și condiționarea în vederea utilizării în alimentație.

17 **CN 104222478 A** se referă la o metodă de obținere a extractului nucifer, care începe prin coacerea miezului de nucă, extracția uleiului la rece, zdrobirea șrotului rezultat după delipidizare, liza enzimatică la temperaturi cuprinse între 45...65°C, recuperarea aromelor, distilarea, concentrarea și adăugarea de materiale auxiliare.

21 **Zijia Zhang, Liping Liao, în lucrarea "Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (Juglans regia L.)", Food Chemistry, 113,(2009), 160-165**, au identificat în extractele nucifere hidrofilice obținute prin solvoliza cu extractanți polari (etanol de 80%), compuși fenolici cu înaltă capacitate antioxidantă, ca de exemplu acizii parahidroxibenzoic, catechuic, vanilie și galic, precum și derivații funcționali ai acestora și propune fracționarea hidrofilică a biomasei nucifere ca sursă de obținere a unor compuși antioxidanți naturali, ca alternativă pentru antioxidanții de sinteză (E-uri), utilizați în prezent pentru protecția peroxidării grăsimilor din produse alimentare.

29 Pe de altă parte, **J. P. Laforet, în patentul American United States Patent No. US 6395261 B1/May 28, 2002, "WALNUT SEED MEAL EXTRACT"**, prin solvaliza hidrofilică a șrotului de nucă rezultat în urma presării la rece a uleiului, demonstrează că în extractul apos nucifer se cumulează compuși naturali cu potențial bioprotectiv relevant de contracarare a stresului oxidativ cauzat de radiațiile solare UVB (cu lungimi de undă de 280...320 nm) care pot induce mutații maligne prin afectarea acizilor nucleici (efecte genotoxice).

35 S-au demonstrat de asemenea, însușirile extractului hidric din șrotul de nucă, de inhibare a degradării rețelilor de collagen și de elastină la nivelul dermei și epidermei, precum și stimularea sintezei proteinelor, a keratinocitelor și a fibroplastelor, și inhibarea metalo-proteinazelor, enzime care generează afecțiuni reumatismale și inflamatorii.

39 Compușii menționați pot fi disponibilizați din șroturile nucifere, prin solvoliza hidrofilică menajantă, iar întrucât în prezent șrotul de nucă rezultat în urma presării la rece este practic utilizat exclusiv în furajare, disponibilizarea compușilor fenolici cu beneficiile sanogene menționate, se va integra în prima etapă a procedurii previzionat, conform prezentei CBI, cu obținerea unui extract fluid nutraceutic, care va integra compușii fenolici cu potențial antioxidant.

45 După separarea extractului fenolic fluid din prima etapă, reziduul remanent se prelucurează în continuare pentru a obține concentratul proteic, utilizabil ca atare și/sau acest concentrat proteic este supus unei solubilizări ulterioare, în mediu alcalin, pentru a disponibiliza la un nivel avansat proteinele nucifere, care ulterior se vor precipita și separa în mediu acid moderat la punctul izoelectric, obținându-se izolatul proteic.

Proteinele nucifere prezintă o înaltă valoare nutraceutică, fiind reprezentate de un conținut echilibrat în aminoacizi esențiali. Deosebit de importantă fiind arginina, aminoacid care are un rol esențial în eliberarea energiei și în imunomodulare, constituind baza de obținere a oxidului nitric (NO), prin intermediul nitritcoxidsintazei (NOS). În șrotul de nucă s-au identificat nivele ale argininei de 2...4% din totalul proteinei.	1 3 5
De asemenea, proteinele nucifere conțin importante cantități de lizină și histidină, precum și aminoacizii cu sulf cistina și metionina.	7
Disponibilizarea proteinelor din șroturile nucifere conform prezentei CBI, poate reprezenta o bază de echilibrare a balanței proteice cu aplicații în numeroase produse din categoria alimentelor funcționale și a suplimentelor alimentare, de asemenea cu utilizări farmaceutice și cosmetice. În prezent, existând o nișă de piață extinsă pentru dietele alimentare tip Vegan, ca alternative la proteinele de origine animalieră.	9 11
Însușirile menționate par a fi corelate cu prezența antioxidantilor naturali, prezenți în nuci în cantități relevante sub forma unor compuși fenolici monomerici și oligomerici.	13
Din miezul de nucă presat la rece, rezultă ulei nucifer la nivele de 50...60% din biomasa nuciferă și un reziduu intens rigidizat alcătuit din macronutrienți proteici și fibre alimentare, ulei remanent 7...9%, în care se încorporează micronutrienți lipofilici, fitoestrogeni și fosfolipide, micronutrienți hidrofilici cu înalt potențial antioxidant, prioritar compuși fenolici. De asemenea în șrotul remanent se regăsesc substanțe minerale, macro și micro elementele biogene, existente în miezul de nucă.	15 17 19
Datorită structurii intens rigidizate, concentrării compușilor fenolici precum și a deteriorării glicolipidelor survenite în urma presării mecanice, șrotul nucifer presat la rece prezintă un gust amar pronunțat și deseori o culoare brun intensă. Din aceste motive șrotul nucifer brut este în prezent utilizat exclusiv în scopuri furajere.	21 23
Procedeul propus în prezenta CBI, vizează prelucrarea integrativă a șrotului de nucă delipidizat în scopul obținerii de compuși nutraceutici, cu obținerea de proteine și fibre alimentare utilizabile în alimentația umană și cu separarea în fracțiuni distincte a compușilor fenolici hidrofilici cu înalt potențial antioxidant.	25 27
Consecutiv extracției uleiului, în șrotul nucifer delipidizat, conținutul în proteină brută se mărește proporțional cu nivelul de îndepărtare a uleiului, de asemenea conținutul în fibre alimentare S.D.F. și I.D.F.	29 31
Dacă în miezul de nucă ca atare, nivelul proteinei brute este de 16...19%, și al carbohidraților de aproximativ 17%, după delipidizare, conținutul în proteină brută poate atinge valori de 40...44%.	33
Spre deosebire de alte resurse oleaginoase, miezul de nucă conține amidon ca atare, la valori minimale de aproximativ 0,2%, carbohidrații fiind reprezentați de fibre alimentare solubile și insolubile S.D.F. și I.D.F. în proporții variabile.	35 37
Compușii fenolici prezenți ca metaboliți secundari, alături de glicolipidele ușor degradabile chiar și în condiții termice minimale, (prin frecare mecanică în timpul presării) imprimă un gust amar și tendințe intensive de îmbrunare.	39
Prin prezenta invenție se vizează fracționarea șrotului nucifer rigidizat și concentrarea în faza fluidă a compușilor fenolici.	41
S-au obținut astfel compoziții nutraceutice cu nivele variate ale conținutului în proteină brută și în fibre alimentare, respectiv concentrate și/sau izolate proteice precum și un concentrat fluid care integrează compușii fenolici cu înalt potențial antioxidant hidrofilic.	43 45
Procedeul de prelucrare a subproduselor nucifere, descris în prezenta invenție, implică și acțiuni fizice de micronizare care să faciliteze un nivel ridicat de biofolosință metabolică.	47

De menționat că din timpuri străvechi în tradițiile orientale miezului de nucă i se atribuie numeroase însușiri sanogene, de fortifiere a organelor interne și de retardare a fenomenelor de îmbătrânire, fiind perceput ca un aliment de tip "Yang", care potențează disponibilizarea energiei vitale.

Recuperarea macro și micronutrienților rezultați sub formă de subproduse prin prelucrarea primară a bioresurselor, reprezintă o preocupare susținută în actualul context, sub aspectul disponibilizării integrale a tuturor compușilor naturali din matricile vegetale, care pot reprezenta o bază complementară de utilizare în domeniul alimentar, farmaceutic sau cosmetic.

Sub aspectul recuperării macronutrienților proteici și a compușilor bioactivi, în ultimii ani s-au dezvoltat procedee diferențiate, având la bază resurse oleaginoase, prioritar semințe oleaginoase din care uleiul s-a extras prin diferite procedee, ca de exemplu presarea la rece.

Deși reziduul remanent după extracția uleiului conține proteine la nivele înalte, utilizarea ca atare nu este indicată, întrucât integrează alături de proteine, compuși indezirabili ca glicozinolați, acid fitic, acizi fenolici, respectiv compuși amari, proveniți din denaturare termică, precum și o stereo structură rigidizată compactă, cu un nivel de digestibilitate scăzut și de asemenea o colorație închisă, cu tendințe de îmbrunare continuă.

Dintre procedeele elaborate și/sau îmbunătățite prin care aceste inconveniente în a utiliza direct în consumul uman proteinele din șroturile oleaginoase, elaborate și/sau îmbunătățite, pot fi reprezentative următoarele :

US 7820226 B2 - PRODUCTION OF FLAX PROTEINISOLATE by Brent Everett Green, Ronald W. Martens, Johann Franz Tergesen, Radka Milanova. Procedetul presupune extracția proteinelor în soluții saline, concentrarea acestora prin procedee membranare, până la nivele de 100...200 g/l, diluarea proteinelor concentrate de aproximativ 10 ori, la temperatura de 15°C, cu sedimentare, pentru a favoriza agregarea unei mase micelare, coalescente, dense, amorfe, gluten like protein micellarmass (PMM), care se concentrază de asemenea prin ultrafiltrare, cu scăderea umidității și eliminarea soluției saline utilizate pentru solubilizarea inițială. Masa micelară se poate utiliza ca atare, sau poate fi uscată prin atomizare, realizându-se un izolat proteic cu o înaltă puritate de minimum 90% (N x 6,25).

Schema fluxului tehnologic, care se realizează în etape sau în flux continuu, conține următoarele utilaje:

Un utilaj de extracție în care se introduce șrotul mărunțit și soluția hidrică salină de extracție a proteinelor, constituită din 0,15M NaCl, în proporție de 1:20. Dispersia rezultată este apoi trecută într-o instalație de filtrare în vacuum, masa reziduală neextrasă se elimină și extractul proteic este trecut într-un vas de clarificare, realizându-se o a doua operație de filtrare și de centrifugare.

Extractul proteic clarificat este pompat în instalația de ultrafiltrare prin membrane (alcătuită din 4 grupuri consecutive de ultrafiltrare), unde se realizează concentrarea proteinelor în retentat și se îndepărtează permeatul. Soluția concentrată de proteine este dirijată într-un vas de precipitare, unde este diluată cu apă rece.

Se formează o masă de proteine micelare, prin staționare în apă rece și sedimentare. Din vasul de precipitare, dispersia micelară este trecută într-un uscător prin pulverizare, pentru a obține în final izolatul proteic uscat ("Spraydryer").

Supernatantul din vasul de precipitare, este trecut cu o pompă printr-o a doua instalație de ultrafiltrare cu membrane (alcătuită din 2 unități de concentrare), pentru a produce o soluție concentrată de proteine în retentat, care este trimisă la a doua unitate de "Spraydryer", pentru a obține adițional izolat proteic uscat.

Raportul dintre șrotul oleaginos, extractantul salin și parametrii de procesare utilizați, prezintă următoarele valori: 16,8 kg șrot mărunțit, 336 L de soluție 0,15 M NaCl, menținere la 13°C, amestecul s-a agitat 60 min, urmat de o perioadă de sedimentare de 60 min.	1 3
S-au recuperat 190 L extract, care a fost filtrat și decantat, după filtrarea fină au rezultat 180 L.	5
S-a obținut o soluție proteică cu un conținut în proteină de 6 g/l.	
Soluția apoasă trecută prin instalația de concentrare cu membrane, s-a concentrat la un volum de 11 L.	7
În instalația de ultrafiltrare porii au prezentat dimensiuni de 30000 Daltoni.	9
Soluției concentrate de proteină i se adaugă apă în proporție de 1:10, la o temperatură de 4°C.	11
Se formează imediat un precipitat alb. Precipitatul este lăsat la sedimentare 16 h, se obține 93 L supernatant decantat și 12 L de precipitat vâscos "Protein micellar mass - PMM", care se usucă pentru a obține izolatul proteic cu un conținut în proteină de 92%. Nivelul proteinei recuperate din proteina existentă în șrot, (nivelul global) a fost de 27% g.	13 15
Procedul prezentat anterior este dezvoltat în continuare în documentul US 7989017 B2 - CANOLA PROTEIN ISOLATE FUNCTIONALITY by Shelley Hiron, W. Martens, E. Donald Murray , cu indicarea a numeroase aplicații alimentare a izolatului proteic cu o puritate de 100%, respectiv în băuturi, deserturi, sosuri, toppinguri, preparate de patiserie, dressinguri, înghețate, maioneze etc.	17 19
S-au dezvoltat de asemenea procedee de disponibilizare complementară a proteinelor, bazate pe procedee enzimaticе, prin care se vizează ruperea pe cale enzimatică a legăturilor dintre lipolizaharidele și lipoproteinele din biomasa oleaginoasă, astfel încât se mărește atât nivelul uleiului recuperat în faza lipofilică, cât și nivelul proteinelor recuperate din faza apoasă.	21 23 25
Bazele conceptuale ale acestor procedee sunt prezentate de Shao Bing Zhang, Zhang Wang, Shi Ying Xu , în lucrarea intitulată, " Optimization of the Aqueous Enzymatic Extraction of Rapeseed Oii and Protein Hydrolysates ", J. Amer Oil Chem Soc (2007) 84; 97-105 . Se obțin concomitent atât uleiuri cât și proteine, prin tratarea dispersiei apoase a rapiței cu carbohidraze, diferențiate, respectiv pectinaze, celulaze, și beta glucanaze, în proporție de 4/1/1, la o concentrație de 2,5%, timp de procesare 4 h. Urmează un nou tratament enzimatic cu protează alcalină (Alcalaza 2,4 L), prin care se obține demulsificarea uleiului și eliberarea proteinelor în extractul apos. Succesiunea etapelor fiind următoarea: semințelor decorticate de rapiță li se adaugă apă în proporție de 1/3 g/v și se fierb 5 min, pentru a inactiva enzima myrosinaza, după care se macină umed timp de 3 min, pentru a obține o dispersie uniformă.	27 29 31 33 35
Dispersia este trecută într-un bioreactor, în care proporția dintre semințe și apă se stabilește la un raport de 1:5 g/v, și pH-ul este ajustat la 5. Se adaugă carbohidrazele în concentrație de 2,5% față de semințele de rapiță. Hidroliza enzimatică se realizează la 48°C, timp de 3 h, cu agitare de 200 rpm.	37 39
În continuare, dispersia este tratată cu enzima proteolitică alcalaza 2,4 L, la 60°C timp de 1 h, la un pH inițial de 9,0. După care dispersia se încălzește la 90°C timp de 10 min, pentru a inactiva enzima proteolitică.	41 43
Consecutiv etapei de hidroliză cu carbohidraze, după o centrifugare timp de 15 min la 3000 rpm, rezultă o fază emulsionată, o fază apoasă și un precipitat.	45
După tratamentul cu alcalaza 2,4 L, 1,5% g/v, se produce o demulsificare a uleiului, rezultând următoarele produse: ulei liber, faza emulsionată, faza apoasă, precipitat.	47

1 Nivelul uleiului liber obținut este relevant, atât sub aspect cantitativ cât și sub aspect
calitativ, cu un nivel de regăsire de 89,7...91,6%.

3 Proteinele s-au recuperat din faza apoasă și gradul de hidroliză s-a evaluat prin
comparație cu proteinele, cu un grad de hidroliză cuprins între 5800 până la 29000 Daltoni.

5 Cel mai înalt nivel de regăsire a uleiului, prin tratamentul cu carbohidraze s-a realizat
7 pentru pectinaze, la valoarea de 85,9%, ceea ce semnifică că în semințele de rapiță poli-
zaharidele care predomină sunt pectinele, iar adițional pot exista și fibre celulozice și hemi-
celulozice.

9 Raportul dintre semințe și apă, afectează semnificativ nivelul uleiului demulsificat,
respectiv a uleiului eliberat din matricea vegetală, fiind inefficient la diluții mari de 1:7...1:8.
11 Proporția de 1:5 substrat:apă, facilitează un nivel înalt al uleiului liber demulsionat.

În condițiile menționate se obțin hidrolizate cu un conținut de aproximativ 96% peptide
13 cu o greutate molecular mai mică de 1500 Da, în care 81% au o greutate molecular mai mică
decât 600 Da.

15 Aceste mici peptide au un larg potențial de aplicare în alimente, cosmetice sau
preparate farmaceutice.

17 Baza conceptuală de valorificare integrată a biomasei oleaginoase inițiate în anul
2007, a fost transpusă pe scară largă la nivel industrial în cadrul procedurii BIOEXX
19 dezvoltat de **David T Bolke în noiembrie 2011 în Canada, în lucrarea intitulată "A Return
to Natural - The Elimination of Solvent Extraction from the Production of Oilseed
21 Protein Isolates"**.

Se utilizează presarea la rece asistată de procedee enzimatică în fază apoasă,
23 vizând obținerea de izolate proteice cu înalte proprietăți funcționale, cu nivele de solubilitate
de peste 80%, cu utilizări diversificate în alimentația umană, la prețuri competitive.

25 Considerând ca prețul izolatelor proteice din soia se cifrează la valori de 3,3 US
\$/7,5 kg, iar prețul proteinelor din lapte la valori de 11...14 US \$/kg, prețul proteinelor izolate
27 din Canola, se poate cifra la valori de 0,94...1,2 US \$/kg (la nivelul anului 2011).

Se fac referiri (fără a furniza date experimentale exacte) la străvechile tehnologii
29 practicate în China, prin care resursele sunt supuse unei extracții apoase în condiții mena-
jante, care nu modifică culoarea proteinelor și nici nu le denaturează structural.

31 Se evită limitarea extractibilității proteinelor și rigiditatea șroturilor care intervine în
procesele obișnuite de presare la rece a resurselor oleaginoase, întrucât presarea mecanică
33 poate genera căldura și deteriora structurile sensibile la tratament termic, ca de exemplu
glicolipidele.

35 Etapele de procesare se desfășoară fără solvent organic, în prese de ulei, urmate de
procedee enzimatică în care proteinele sunt izolate în faza apoasă și în final obținerea
37 concomitentă direct din semințe a uleiului și a izolatelor proteice.

Procedeeul se aplică pe resurse oleaginoase provenite din culturi organice cu înalt
39 nivel de sustenabilitate ambientală și cu diversificarea gamei de utilizări a proteinelor vege-
tale, inclusiv în alimentația copiilor.

41 **Claudia Pickard, Peter Fisner, Stephanie Rader, "Protein preparation Producer
from rape seeds, USA 0301074 A1, 8 decembrie 2011**, - abordează problema valorificării
43 proteinelor din resurse oleaginoase sub forma unor concentrate proteice, în care nivelul
proteinei remanente este 40...70%, dar care prezintă însușiri funcționale de retenție a apei,
45 de gelifiere, emulsionare și spumare similare cu a izolatelor proteice cu nivele ale proteinelor
de peste 90%.

Avantajul procedeului constă în posibilitatea excluderii unor etape de procesare care necesită tehnologii cu un aport investițional mai puțin accesibil, ca de exemplu concentrarea prin procedee de membrane sau prelucrările enzimactice costisitoare la nivelul transpunerii industriale, prin complexitatea condițiilor impuse de coordonarea riguroasă a parametrilor biotehnici.	1 3 5
Obținerea concentratelor proteice, necesită numai operații de purificare a șrotului, prin eliminarea compușilor indezirabili la limite acceptabile, ca de exemplu a glicozinolaților, a acidului fitic și a fenolilor, necesitând numai operații de solvoliză a acestora, cu remanență integrală a proteinelor și a fibrelor alimentare.	7 9
De menționat că în acest caz operațiile se pot desfășura într-o singură etapă, cu eliminarea solventului de extracție în care se acumulează compușii indezirabili, rezultând concentratul proteic și fibrele alimentare ca atare sub formă de dispersie, care se usucă și se mărunțește fin pentru a le mări apoi nivelul de biofolosință.	11 13
Inițial concentratele proteice vegetale s-au obținut prin extracții cu solvent izopropanol de 45%, iar ulterior prin extracții în etanol de 80%, la temperatura de 60°C, deci exclusiv prin extracție cu solvent în scopul îndepărtării glicozinolaților, acidului fitic și a acizilor fenolici, iar după extracția compușilor indezirabili nu a mai fost necesar un alt tratament.	15 17
S-a preferat obținerea de concentrate proteice fără eliminarea carbohidraților, dar care s-au dovedit a avea proprietăți funcționale apropiate de a izolatelor proteice, întrucât izolatele proteice propriu zise necesită un nivel foarte înalt de purificare, sunt scumpe, și complicate în a fi produse la nivel industrial.	19 21
Prin procedeul descris, deși nivelul proteinei este inferior celui existent în izolatele proteice, proprietățile funcționale sunt în cea mai mare parte similare, dar în condițiile în care recoltarea materiei prime (a resurselor oleaginoase), decorticarea semințelor și presarea uleiului din semințe are loc în condiții corespunzătoare ca de exemplu: după recoltare, semințele se usucă la temperaturi care nu depășesc 95°C, timp de 10...20 min., conținutul în apă după uscare, să fie mai mic de 9%, preferabil 7%, aspect important pentru a inhiba enzimele degradative ca de exemplu myrozinaza.	23 25 27
Decorticarea se realizează prin separarea a două fracțiuni: fracțiunea bogată în miez și fracțiunea bogată în coji. Se utilizează fracțiunea care prezintă un conținut minimal în coji, preferabil sub 5%.	29 31
Temperatura pe durata presării nu trebuie să depășească 60°C. Extracția reziduului după presarea uleiului, se realizează cu alcool apos, în care conținutul în etanol se situează la valoarea de 60...95% v/v, preferabil între 70...80% v/v.	33
Această metodă diferă de obținerea izolatelor proteice cunoscute, prin aceea că izolatele proteice sunt extrase din matricea fibroasă și ulterior sunt recuperate din soluția de extracție prin precipitare.	35 37
După extracția compușilor indezirabili, alcoolul este îndepărtat, preferabil utilizând vacumuul, la o temperatură de maximum 60°C, ulterior concentratul proteic este uscat, regimul de uscare depinzând de conținutul rezidual în apă. Ulterior preparatul este mărunțit sub formă de pulbere fină, pentru a-i mări nivelul de biofolosință sub aspectul proprietăților funcționale.	39 41
Concentratul proteic poate fi utilizat ca aditiv alimentar. Se prezintă sub forma unor colorații gălbuie cu un nivel înalt de înlăturare a compușilor indezirabili. Conținutul în proteină brută variază între 40...70%; conținutul în fibre celulozice 3...20%; conținutul total în fibre alimentare "Total dietary fibers" - 20...40%; grăsime maximum 6%; acizi fenolici maximum 0,5%; lignina maximum 1%.	43 45 47

1 Conținutul în acizi fenolici și în compușii indezirabili este net inferior celui din șrotul
inițial.

3 Disponibilizarea proteinelor cu bune însușiri funcționale din subprodusele
oleaginoase reprezintă o preocupare permanentă a nutriționiștilor. Astfel, în cadrul celui de-al
5 treilea congres **Est European de Alimentație, susținut la Brașov în 20-23 mai 2015,**
6 **autorii Tamara Nosaenko, Valeriy Mank Anastasiya Lebid, în lucrarea "The content of**
7 **phenolic substances and sunflower protein functionality"**, obțin izolate proteice la pH-uri
diferențiate de 6,5...11,0 și proteine parțial hidrolizate cu proteaze.

9 Fenolii identificați sunt reprezentați de acizii fenolcarboxilici clorogenic și cafeic, care
sunt îndepărtați prin extracții succesive din șrotul de floarea soarelui cu soluții etanolice de
11 70% v/v, pentru a minimiza nivelul fenolilor remanenți și a evita îmbrunarea proteinelor
extrase.

13 Se obțin produse proteice cu o bună capacitate de emulsionare, culoarea nu
influențează proprietățile funcționale.

15 Se preferă preparatele proteice obținute prin hidroliza enzimatică parțială care pre-
zintă proprietăți funcționale mai bune și colorații mai deschise.

17 Necesitatea echilibrării balanței proteice deficitare a determinat extinderea proce-
deelor de extracție a proteinelor din diverse resurse vegetale și din alte sortimente de legu-
19 minoase decât soia.

21 În documentul **US 8309159 B1** cu titlul **"Process for obtaining legume protein**
22 **fractions of moderate molecular weight, legume protein fractions and use thereof"**,
autorii prezintă un procedeu de fracționare a leguminoaselor cu obținerea de proteine cu
23 greutate moleculară medie.

25 Se are în vedere obținerea a două fracțiuni proteice din leguminoase precum
mazărea, fasolea, lupinul, respective a unor fracțiuni proteice cu o greutate moleculară mai
mare decât 14 kD și a unei fracțiuni cu greutate moleculară cuprinse între 116 și 600 kD, cu
27 următoarele etape de procesare: a. Obținerea fracțiunii fluide din suc celular prin fărâmița-
rea boabelor de leguminoase, cu un eventual adaos de apă, la valori ale pH-ului cuprinse
29 între 2...10, cu o durată variabilă a timpului de macerare, de la 10 min la câteva ore.
Dispersia se presează și se centrifughează, reziduul se separă și supernatantul fluid este
31 utilizat pentru izolarea proteinelor; b. pH-ul soluției se ajustează la valori ale pH-ului cuprinse
între 4,0...6,0, la temperaturi de 50...85°C, se obține un precipitat la punctul izoelectric,
33 care se separă mecanic prin decantare/centrifugare; c. Proteinele precipitate se purifică prin
spălare cu apă, pentru a obține un izolat cu un conținut în proteină mai mare de 85%.
35 Cantitatea de apă de spălare este aceeași sau de 2 ori mai mare decât produsul existent în
decantorul centrifugal. Procesul se desfășoară în două etape și în două decantoare. Rezultă
37 o primă fracțiune proteică precipitate, care se separă în decantorul centrifugal și un
supernatant fluid. Supernatantul fluid este încălzit la 80°C și pH-ul acestuia se ajustează la
39 un nivel de pH apropiat de 5,0. Are loc precipitarea fracțiunii cu greutate moleculară medie,
care se separă în decantor. Ca exemplificări privitoare la randamente, rezultă că din 50 kg
41 mazăre decortă rezultă 2,5 kg sediment proteic și 5 kg de proteine cu greutate medie,
ambele cu umiditate de 7%. Deci în final rezultă în total 7,5 kg proteine, cu un randament
43 aproximativ de 15%. Alte leguminoase ca de exemplu linte, constituie în prezent o sursă
atractivă din punctul de vedere al obținerii de izolate proteice. Fracțiunea 1, 100-600 kD,
45 fracțiunea 2, 14-97 kD. Proteinele din mazăre se pot utiliza ca agent de emulsionare, fără
efecte alergice (hipoalergic), în sosuri și salate, în patiserie, pentru supe-creme de legume,
47 ca substraturi cu înalt nivel proteic. Alte leguminoase ca de exemplu linte, constituie în
prezent o resursă atractivă din punctul de vedere al obținerii de izolate proteice.

“Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality”; M.jarpa Parra, F.Bamdad, Y.Wang, Z.Tian, F. Temelli, Jay Han, L.Chen, *Food Science and Technology*, **57**, (2014), **461-469**. Se evidențiază parametrii tehnologici sub aspectul randamentelor și al funcționalității de obținere a izolatului proteic din linte. Lintea, cu un conținut în proteină brută variabil, între 20,6 și 34%, alcătuită din proteine cu greutate moleculară cuprinse între 50...80 kD, prioritar globuline, cu o bună digestibilitate, se procesează cu evaluarea randamentelor prin aplicarea metodologiei definită ca "Response Surface Methodology". Prin această metodă, s-a stabilit că parametrii optimali sunt reprezentați de un nivel al pH-ului de 9 unități pH, raportul între substrat și solvent este de 1:10, rezultând o cantitate de extract proteic de 14,5% cu un nivel de puritate al proteinei de 82%, extracția realizându-se la 22°C, timp de 1 h. Mediul alcalin se realizează cu soluții diluate de NaOH.

Extracția la nivele mai ridicate ale pH-ului (peste 10 unități pH) poate avea repercursiuni negative asupra funcționalității proteinelor. Lintea este imersată în apă distilată și pH-ul 9,0 se stabilește cu soluție 0,1 M de NaOH. După extracție, fracțiunea insolubilă se îndepărtează prin centrifugare la 8500 rpm, timp de 15 min, la 23°C. Supernatantul a fost ajustat la pH egal cu 4,2, cu 0,1 moli/L HCl, s-a lăsat peste noapte la precipitare, la 4°C, după care amestecul a fost centrifugat la 1590 rpm, timp de 30 min. Precipitatul proteic se separă de faza fluidă și se usucă apoi în vid, sub formă pulverulentă. S-au inițiat procedee de valorificare a compușilor naturali antioxidanți, din subproduse oleaginoase fluide, sub formă de dispersii sau sub formă fluidă, respectiv a unor subproduse provenite din prelucrarea extractivă a fructelor de palmier, sau a altor plante ierboase sau arboricole, după extracția uleiurilor.

US 8309145 B2 - “Treatment of vegetation liquors derived from oil-bearing fruit by Ravigadevi Sambanthamurthi”, Yew Ai Tan, Kalyana Sundram. Procedul implică îndepărtarea părților solide a reziduurilor oleaginoase, a coloizilor și a compușilor cu greutate moleculară mare din fracțiunile fluide vegetale și în final obținerea unei fracțiuni apoase, care conține fitochimicale cu potențial antioxidant, ca de exemplu flavonoide, acizi fenolici și hidroxiacizi. Compușii fenolici izolați pot fi integrați în băuturi, produse alimentare tonice, suplimente alimentare, aditivi antioxidanți, cosmetice, săpunuri, șampoane, detergenți, sau produse medicinale.

(1) Un prim exemplu se referă la dispersii oleaginoase (vegetation liquor) care se autoclavează la 120°C, timp de 15 min, după care se adaugă apă în proporție de 3:1.

Dispersia se filtrează și apoi se centrifughează, pentru a obține un permeat cu greutate moleculară mai mică, de 10000 D. Supernatantul apos conține compuși fenolici bioactivi, care se extrag cu acetat de etil. Anterior, pH-ul soluției apoase se ajustează la pH egal cu 7,0, prin adăugare de NaOH, și apoi la pH egal cu 2,0, prin adaos de HCl.

(2) Dispersiile uleioase fluide se autoclavează la 120°C, timp de 40 min, și apoi se filtrează. Filtratul este colectat și apoi este pompat într-o instalație de ultrafiltrare, conținând membrane cu dimensiuni ale porilor adecvate separării unor molecule cu o greutate moleculară mai mică de 10000 D. Fracțiunea apoasă este prelucrată identic ca în exemplul (1), obținându-se acizi fenolici și flavonoide, prin extracție cu acetat de etil.

În general, din subprodusele menționate se obțin 3 fracțiuni; fracțiunea uleioasă, care conține acizi grași liberi, fracțiunea coloidală, care conține substanțe proteice și fracțiunea aposă, în care se găsesc substanțe minerale (fier, fosfor, calciu, magneziu) și flavonoide respectiv: catechina, catechingalat, epicatechina, epigallocatechina, epigallocatechingalat, quercitina. De asemenea, acizi fenolici, cafeic, protocatechuic, vanilic, ferulic, clorogenic, galic, syringic, cumaric, tanic. Se mai pot regăsi și hidroxiacizii citric, ascorbic, lactic, glicolic, fumărie, tartric, salicilic.

Prin utilizarea de membrane filtrante cu dimensiunea porilor de 3000 D, se pot obține și proteine cu un nivel de puritate corespunzător unor aplicații diferențiate. Frațiunea apoasă în care se regăsesc compușii bioactivi din categoria flavonoidelor, a acizilor fenolici, și a hidroxiacizilor, se usucă preferabil prin uscare menajanta "Freeze Drying". Media conținutului în flavonoide din soluția apoasă este de aproximativ 40000 ppm/kg produs procesat. Din frațiunea apoasă, prin concentrare și uscare, se pot obține substanțele pure. Spre deosebire de numeroasele preocupări privitoare la extracția și/sau concentrarea proteinelor din resursele oleaginoase provenite din semințe, până în prezent există puține referiri privitoare la procesarea subproduselor rezultate în urma obținerii uleiului din miezul de nucă.

US 6395261 B1 - "Walnut seed meal extract" by Jean Pierre Laforet, prezintă un procedeu de extracție în mediu exclusiv hidric cu utilizări cosmetice și dermatologice. Extractul s-a obținut prin macerarea reziduului delipidizat din miezul de nucă în apă, urmat de concentrarea extractului apos.

Anterior publicării brevetului menționat, se indică utilizări empirice tradiționale ale extractelor provenite din șrotul de nucă în compoziții cosmetice pentru spălătul părului ca atare sau în combinații cu extracte alcoolice și cu salicilați. Se consemnează de asemenea extracte din scoarțe și rădăcini de nuc cu proprietăți germicide. Extractele menționate conțin cantități variabile de naftochinone (juglona) utilizate și ca coloranți pentru păr.

Autorii lucrării menționate anterior, au evidențiat că izolatele din șrotul de nucă prezintă numeroase proprietăți avantajoase în urma extracției hidrice, urmată de o etapă de concentrare.

Extracția șrotului nucifer poate include operații de macerare, percolare, extracție cu microunde sau cu ultrasunete. Este preferabil ca extracția să fie realizată la temperatura camerei, pentru a nu afecta compușii bioactivi. Timpul de extracție este dependent de procedeele de extracție a uleiului de nucă, utilizate anterior obținerii șrotului nucifer.

Proporția dintre șrot și solventul apos este dependentă de echilibrul dintre cantitatea de solvent necesară pentru a se realiza o extracție eficientă și timpul necesar pentru a îndepărta solventul. Proporția rezonabilă s-a stabilit a fi între 1/99 și 20/80. S-a găsit ca raportul 5/95 este o variantă convenabilă, temperatura avantajoasă este de 3...10°C, cea mai avantajoasă fiind în jur de 4°C.

O temperatură mai joasă poate forma gheață, o temperatură mai ridicată poate minimiza compușii bioactivi. Timpul optimal de extracție este de 20 h. Pentru obținerea extractului sub formă de pulbere este necesară o uscare menajantă "Freeze Drying".

O proprietate foarte importantă este capacitatea extractului din șrotul nucifer de a proteja pielea de oxidarea intracelulară cauzată de stresul oxidativ consecutiv expunerii la radiațiile solare de tip UVB.

De menționat demonstrarea de către aplicanți a efectului de inhibare a modulatorilor epidermici de către extractele din șrotul de nucă cu efect de stopare a proceselor inflamatorii, respectiv reducerea sintezei oxidului nitric (NO) și a factorului proinflamator TNF-ALFA. Însușirile menționate justifică utilizarea extractului nucifer în produse cosmetice, cu efecte bioprotective față de stresul ambiental cauzat de poluanții chimici și alergeni.

S-au identificat și efecte de retardare a fenomenelor de îmbătrânire a pielii, prin stimularea sintezei keratinocitelor în epidermă și a fibroplastelor în dermă cu inhibarea enzimelor care pot provoca denaturarea colagenului. Se combat astfel fenomenele de senescență și formarea de riduri.

Cu trecerea timpului, se poate produce degenerarea rețelelor de colagen și de elastină, cu descreșterea conținutului în glucozaminoglicani, în particular cu a acidului hialuronic. Aceste modificări se datorează descreșterii capacității fibroplastelor de a sintetiza

matrixul extracelular și a dezechilibrului unor proteinaze, mai ales a Metaloproteinazei. Aceste fenomene pot fi inhibitate prin aplicarea extractelor provenite din șroturi nucifere. Extractul poate fi realizat în mediu exclusiv hidric, la un raport de 5/95, temperatura de extracție preferată fiind de 4°C. Produsul pulverulent este preferabil a se obține prin procedeul "Freeze Drying".

S-a demonstrat ca la nivele de 10 până la 250 µg/ml din extractul nucifer pot fi obținute efecte benefice de bioprotecție celulară față de radiațiile solare UVB, de asemenea efecte antiinflamatoare și de retardare a îmbătrânirii la nivelul pielii, prin inhibarea degenerării rețelilor de collagen și de elastină, cu menținerea integrală în piele a acidului hialuronic.

Studiile pe culturi celulare au evidențiat potențialul extractului hidric din șrotul nucifer de creștere a proteinelor celulare în special al keratinocitelor la doze minime de 0,1...0,25 mg/ml.

Se remarcă un efect relevant de încorporare a aminoacidului leucină în proteinele sintetizate de fibroplastele umane.

În compozițiile cosmetice bioprotective se utilizează soluțiile hidrice obținute prin extracția șrotului nucifer consecutiv operațiilor de concentrare menajantă. Dozele utilizate se integrează în limitele de 10...40 g/l solvent, preferabil 30 g/l.

În practică se utilizează compoziții conținând între 0,5 până la 10%, avantajos între 2...6% în greutate, din soluția extrasă conform invenției.

Compozițiile cosmetice pot fi creme, geluri, microemulsii cu utilizări în tratamentele de antiîmbătrânire a pielii și de bioprotecție față de stresul ambiental în special față de radiațiile UVB.

În cremele antiîmbătrânire, doze de 30 g/l.

Concluzionând, avantajele utilizării extractelor hidrice din șrotul nucifer se pot concretiza prin următoarele activități bioprotective:

- stimularea sintezei proteinelor în particular ale celulelor dermei și epidermei;
- însușiri antiîmbătrânire, antiriduri;
- contribuții nu numai la îmbătrânirea intrinsecă, ci și la stimularea metabolismului celular însușiri antiinflamatoare față de stresul ambiental, în particular față de radiațiile UV.

Operațiile de concentrare a extractului inițial pot fi realizate prin aplicarea procedurii de osmoză în faza reversă. Compozițiile cosmetice pot conține 0,5...10% din extractul concentrat. Compozițiile cosmetice pot conține aditivi de integrare în proporții de 90...99,5%. În aceeași arie de interes a valorificării de subproduse, se vizează optimizarea substratului obținut prin procesarea învelișurilor exterioare ale bananelor ("unripe"). Se aplică pretratamente cu acizi organici, respectiv cu acizii citric, lactic, ascorbic, acetic, benzoic, fumaric și sorbic. Acest pretratament îmbunătățește proprietățile fizice și funcționale precum și activitatea antioxidantă a compușilor fenolici.

Effect of organic acid pretreatment on some physical, functional, and antioxidant properties of flour obtained from three unripe banana cultivars; Tonna A. Anyasai, Afam I.O. Jideani, Godwin R.A. Mchau, Accepted Manuscript, Food Chemistry, 09. 2014, învelișurile exterioare ale bananelor conțin carbohidrați indigestibili, amidon rezistent la hidroliză, fibre alimentare și polifenoli și se prelucrează pentru a obține o făină cu indice glicemic scăzut, cu utilizări fitoterapeutice în produse antidiabetice și de prevenire a cancerului de colon. Se utilizează ca un substituent pentru făina de grâu. În prezent consumul acestui produs din cojile de banane s-a extins rapid la nivel global, sub formă pulverulentă. Pretratamentul cu acizi organici s-a dovedit că inhibă imbrunarea enzimatică și dezvoltarea microorganismelor. Pretratamentele se realizează pe substraturile mărunțite la dimensiuni de 4 mm și se pretratează cu acizii organici menționați la concentrații

de 10...20 g/l, timp de 10 min. Se remarcă o deschidere a culorii substratului, care se atribuie efectului de antiîmbrunare a acizilor organici. După pretratament materialul se usucă în vid la temperatura de 70°C, timp de 12 h, și în final produsul uscat se mărunțește pentru a obține un concentrat pulverulent (UBF "unripe banana flour"). Sub aspectul proprietăților funcționale și al culorii, cele mai bune rezultate s-au obținut cu acidul ascorbic. Pretratamentele cu acizi organici măresc cantitatea de fenoli totali, la valori cuprinse între 1081 până la 1130 mg echivalenți acid galic/100 g substanță uscată, consecutiv pretratamentelor cu acizi organici la concentrații de 10...20 g/l. Produsul final "UBF" se consideră eficient și din punctul de vedere al conținutului în polifenoli cu efecte antioxidante, care pot reduce incidența afecțiunilor degenerative. În prezent, asistăm la o creștere a interesului pentru prelucrarea de subproduse din categoria învelișurilor exterioare ale grăunțelor cerealiere, respectiv coji, pleavă și tărâțe, întrucât concentrația în compuși bioactivi a acestor structuri vegetale exterioare, este mult mai mare comparativ cu a cerealelor decorticate. Pe de altă parte, învelișurile exterioare sunt intens rigidizate, astfel că accesul la principiile active este limitat în cazul unei mărunțiri obișnuite. Se practică procedee fizice avansate de micronizare pentru a remedia acest aspect.

În lucrarea "***Effect of micronization technology on physicochemical and antioxidant properties of dietary fiber from buckwheat hulls***"; Fengmei Zhu, Bin Du, Runfeng Li, Jun Li, ***Biocatalysis and Agricultural Biotechnology***, 3, (2014), 30-34, se aplică procedee de mărunțire ultrafină la presiuni înalte de 70 Mpa (7000 atm), cu prelucrare în flux de aer (Airflow pulverization instrument QLM-80K Shangyu), cu obținerea de particule cu dimensiuni submicronice. Această prelucrare prin micronizare crește considerabil nivelul fenolilor totali disponibilizați din subprodusele de hrișcă, proprietățile funcționale de retenție a apei și uleiului precum și capacitatea antioxidantă bioprotectivă.

Concluzionând, micronizarea aplicată comparativ cu mărunțirea obișnuită la 40 Mesh poate reprezenta o modalitate complementară de optimizare a însușirilor fitoterapeutice și în cazul altor subproduse care integrează în componenta lor compuși fenolici cu potențial antioxidant (ca de exemplu subprodusele nucifere după delipidizare).

Un domeniu cu certă perspectivă de extindere, este reprezentat de producția alimentelor funcționale care integrează polipeptide biologice active, provenite din proteinele alimentare prin procesare cu metode integrate. Aceste structuri oligomerice posedă numeroase însușiri sanogene, respectiv potențial hipertensiv, antioxidant, antiinflamator și hipocolesterolemic. S-a dovedit eficiența deopotrivă fitoterapeutică și profitabilă sub aspect economic, de obținere a oligopeptidelor biologice active, din resurse mai convenabile decât proteinele animale, prin combinarea de procedee fizice avansate cu procedee enzimatice. Substraturile naturale pot fi reprezentate de resurse proteice de origine vegetală, mai ieftine și libere de alergeni, ca de exemplu boabele de linte. Procedeele combină tratamentele la presiuni foarte înalte, de ordinul sutelor de MPa cu tratamentele enzimatice cu proteaze alcaline, la pH egal cu 8,0.

Un astfel de procedeu avansat este prezentat în lucrarea "***High - pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins***", P. Garcia-Mora, E. Penas, J. frias, R. Gomez, C. Martinez-Villaluenga, ***Food Chemistry***, 171, (2015), 224-232". S-a vizat obținerea de polipeptide oligomerice cu o greutate moleculară mai mică de 3 kDa din linte, cu efecte de inhibare a enzimei de conversie a Angiotensinei (ACE - EC .3.4.15), enzima care este un regulator principal al tensiunii sanguine, cu implicații strategice în tratamentul hipertensiunii și al afecțiunilor cardiovasculare. S-au obținut hidrolizate

peptidice bioactive, prin asocierea presiunilor hidrostatice (HP) de ordinul a 500 MPa, cu
enzimele proteolitice Alcalaza 2,4 L, Savinaza 16kNDUGr, Protamax (1,5 Au/g) și Corolaza-
AB ENZYMES GmbH Darmstadt, Germania. Boabele de linte mărunțite la 60 Mesh, s-au
suspendat în apă la un raport de 1:10 g/vol și apoi pH-ul s-a ajustat la 8 unități pH. Suspen-
sia s-a agitat la 20°C timp de 1 h, după care suspensia proteică de 2% g/v s-a supus hidro-
lizei enzimatică la un raport al substratului de 0,1 unități Anson/mg de proteină solubilă. Tra-
tamentul cu presiune înaltă (HP) de până la 500 MPa s-a menținut staționar timp de 15 min.

S-au obținut polipeptide cu capacitate biologică înaltă, evidențiată prin nivelul
insusirilor antioxidante și al capacității de inhibare a enzimei ACE.

S-au remarcat variantele hidrolizate enzimatic cu "Savinaza" și procesate cu HP, la
300 MPa, cu nivel înalt de inhibiție a enzimei AC și activității antioxidante obținute într-un
timp relativ scurt, de 15 min, expunere la presiunile menționate.

În hidrolizate s-au obținut aminoacizii bioactivi ca: alanina, valina, leucina, și fenil-
alanina, la carbonul terminal; toți acești aminoacizi fiind considerați ca reziduul țintă pentru
situsul catalitic al acestei enzime.

Privitor la interrelațiile structură-activitate antioxidantă, tirozina și triptofanul sunt
considerate ca fiind principalii responsabili pentru activitatea antioxidantă a peptidelor.
Fracțiunea peptidică cu cea mai înaltă concentrație de peptide și cu greutatea moleculară
mai mică decât 3 KDa, prezintă și cel mai înalt nivel de inhibiție asupra enzimei ACE.

Enzima de conversie a ACE "Angiotensin converting enzyme" reprezintă unul din
principalii reglatori ai presiunii sanguine prin urmare, inhibiția acestei enzime, reprezintă o
strategie pentru reglarea presiunii sanguine și o corelare cu afecțiunile cardiovasculare.

În prezent, s-a evidențiat legătura hipertensiunii cu stresul oxidativ care afectează
funcțiile celulare, reduce nivelul de biofosforină al oxidului nitric endotelial și mărește
oxidarea lipoproteinelor cu densitate mică.

Alimentele funcționale conțin proteine bioactive și peptide, prin care s-a demonstrat
minimizarea factorilor de risc față de afecțiunile cardiovasculare. Polipeptidele biologic active
eliberate din proteinele alimentare posedă proprietăți bioactive antiobezogene, antioxidante,
antiinflamatoare și antihipercolesterolemice. Din acest motiv există un mare interes de a
produce hidrolizate funcționale conținând peptide bioactive. Acest gen de produse va putea
fi obținut și prin prelucrarea proteinelor nucifere în a căror componentă s-au evidențiat
aminoacizii cu potențiale implicații în inhibarea ACE.

Problema tehnică pe care își propune să o rezolve invenția este de a asigura
obținerea unor produse nutraceutice de tip nucifer cu potențial antioxidant și conținut crescut
de proteină.

Soluția tehnică în această problemă constă în prelucrarea integrată a șrotului nucifer
rezultat în urma extracției uleiului din miezul de nucă, în etapele de condiționare și purificare
a subprodusului oleaginos, precum și în parametrii tehnologici optimizați și anume în
prepararea extractului nutraceutic hidroacetic din șrotul de nucă delipidizat, prin condițio-
narea șrotului mărunțit la 40 Mesh, cu îndepărtarea impurităților reprezentate de compuși
cu început de caramelizare, cu gust amar, prin spălări cu apă deionizată la un raport de 1:10,
timp de 60 min, în 2 reprize consecutive, separarea rezidului spălat prin filtrare și apoi
macerarea acestuia în oțet alimentar de 9%, timp de 6...8 h, separarea supernatantului fluid
care apoi se lasă la sedimentare la 4...8°C, pentru depunerea suspensiilor fine, timp de 2 h,
după care se decantează și se filtrează obținând un extract fluid cu un conținut în fenoli totali,
exprimat în Echiv de acizi galici, de 2000...2100 mg/l, cu un conținut în fibre solubile S.D.F
de 0,1...0,2 g/l și micronutrienți minerali solubili în mediu acetic la nivele variabile. În extractul
nutraceutic hidroacetic, prin determinări HPLC - MS, s-au identificat compuși antioxidanți de

tipul acizilor fenolcarbozilixi, respectiv acizii para cumaric, galic, ferulic și elagic, și flavonoida Kaempferol. De asemenea pirogalolul. Prin cromatografie GC-MS, s-au identificat compuși mai volatili, respectiv aldehida vanilică, p-Menth-4-en-3-one, Furfylcarbinol, Diizobutylphthalat, Histrene. "Produsul Extract fluid nutraceutic cu potențial antioxidant", prezintă un miros aromatic caracteristic de nuci, o culoare slab gălbuie și constituie un substrat de obținere a oțeturilor aromatice.

a. Prepararea concentratului proteic nucifer reziduul remanent consecutiv macerării acetice, se tratează în 2 etape succesive cu apa deionizată, la un raport de 1:6, 1:10, pentru a îndepărta oțetul remanent. Durata de spălare 15 min. După care supernatantul apos se îndepărtează prin filtrare și reziduul se usucă menajant în uscătorul cu trepte de temperatură și ventilație cu aer cald, până la o umiditate de maximum 10%. Concentratul obținut prin uscare este constituit din proteine nucifere și din carbohidrați funcționali care sunt reprezentați de fibrele alimentare la nivele de 30...40%. Conținutul în proteină brută al concentratului proteic (N x 6,25) este de minimum 38...40%, prezentând avantajul ca prin operații exclusive de spălare, nivelul proteinei regăsite, comparativ cu proteina din șrotul inițial, se situează la valori de minimum 50%. Concentratul nucifer nu conține carbohidrați amidonoși, astfel încât reprezintă un substrat nutraceutic cu indice glicemic scăzut, utilizabil în alimente funcționale destinate diabeticilor și celor cu afecțiuni cardiovasculare.

b. Prepararea izolatului proteic nucifer Concentratul proteic neutralizat umed sau deshidratat, se solubilizează în mediu alcalin cu o soluție de 0,1 M NaOH, timp de 2...3 h, la un raport de 1:10, la întuneric, la temperatura mediului ambiental, cu agitare lentă. Supernatantul în care s-au solubilizat proteinele nucifere se separă de reziduu și se precipită cu oțet alimentar de 9%, la un pH egal cu 3,2...4,0. Dispersia se lasă la sedimentare timp de 6...8 h, pentru consolidarea miceliilor proteice, după care sedimentul proteic se separă prin filtrare și se usucă în uscătorul cu trepte de temperatură și ventilația cu aer cald. Rezultă precipitatul proteic cu conținutul în proteină (N x 6,25) de minimum 65...70%. Întrucât prin operațiile succesive de solubilizare au loc pierderi, randamentele de regăsire în izolatul proteic față de proteina din șrot se situează la valori de 22...27%. Izolatele proteice pot prezenta utilizări diversificate ca resurse de echilibrare a deficitului proteic dar și pentru proprietățile funcționale ale acestora, ca de exemplu capacitatea de retenție a apei și a uleiului, capacitățile de spumare, gelifiere și de emulsionare. Sunt preferate în dietele tip Vegan, ca alternative la proteinele de origine animalieră.

Exemplu

Șrotul de nucă obținut prin presarea la rece a miezului de nucă, cu un conținut în proteină brută de 42,2...47,5%, un conținut în carbohidrați oligomerici de 37,7...42,5% și un conținut în ulei remanent de 7...9%, se mărunțește la dimensiuni de 40 Mesh. Produsul pulverulent se iversează în apă deionizată în proporție de 1:10 și se agită, timp de 60 min. Se separă reziduul nucifer de apele de spălare în care s-au solubilizat compuși secundari termolabili care pot rezulta în urma procesării mecanice a miezului de nucă, ca de exemplu glicolipidele și monozaharidele cu început de caramelizare. Acești compuși pot imprima un gust amar și în contact cu aerul prezintă tendințe de îmbrunare. Repetarea operației de spălare cu apa deionizată poate îndepărta în cea mai mare parte acești compuși indesezirabili. Substratul nucifer rezultat în urma îndepărtării apelor de spălare, se iversează la un raport de 1:10 în oțet alimentar de 9%, dispersia se agită cu intermitentă și se menține la extracție la temperatura mediului ambiant timp de 6...8 h. Urmează separarea fazei fluide hidroacetice de substratul nucifer remanent, în care prin extracție în mediu acid moderat, s-a produs solubilizarea compușilor fenolici. Se obține un produs fluid cu un nivel al fenolilor totali de 2000...2100 mg/l echivalent acid galic.

RO 131711 B1

În extractul fluid, prin analize HPLC - MS, s-au identificat compuși antioxidanți de tipul acizilor fenolcarboxilici, respectiv acizii paracumaric, galic, ferulic și elagic, precum și flavonoida Kaempferol. De asemenea pirogalolul.	1 3
Prin cromatografie GC-MS, s-au identificat compuși mai volatili, respectiv aldehida vanilică, p-menth-4-en-3-one, Furfylcarbinol, Diizobutyltalat, Histrene. Extractul acetic prezintă caractere senzoriale superioare, întrucât în faza hidrofilică se regăsesc și aromele specifice de nucă.	5 7
De asemenea, fibre solubile S.D.F. la nivele de 0,1...0,2 g/l (identificate gravimetric prin precipitare cu izopropanol în raport de 1:1).	9
În extractul acetic, se solubilizează parțial și substanțele minerale existente în miezul de nucă la nivele variabile, depinzând de soiurile de nuci și de caracteristicile pedoclimatice ale arealului din care provin nucile.	11
Deci la concentrații medii, prin conținutul în compuși fenolici cu înaltă capacitate antioxidantă, fibre solubile S.D.F., substanțe minerale și arome nucifere caracteristice, extractul hidroacetic reprezintă un produs fluid individualizat ca atare și constituie prima fracțiune a procesării integrative care se va ambala în sticle de culoare brună de 250...50 ml, cu denumirea generică de "Extract nutraceutic hidroacetic nucifer cu potențial antioxidant".	13 15 17
În continuare, după separarea extractului hidroacetic, reziduul din care s-au îndepărtat compușii fenolici, se imersează din nou în apa deionizată la un raport de 1:6...1:10, în 2 etape succesive, pentru a elimina oțetul și a obține un reziduu nucifer la pH neutru.	19 21
Durata de imersare în apă deionizată pentru a îndepărta mediul acid este de 15 min pentru fiecare etapă. Reziduul umed neutralizat, se usucă în uscătorul cu trepte de temperatură și cu ventilație cu aer cald, până la umiditatea de maximum 10%.	23
După uscare, pentru a mări nivelul de biofolosință a concentratului nucifer, produsul poate fi micronizat la dimensiuni de 15...25 microni, în moara coloidală uscată, obținându-se o pulbere fină, bej-galbuie, constituită din proteine și carbohidrați funcționali în proporții variabile. Conținutul în proteine poate reprezenta variații, cu nivele de minimum 38...40% (N x 6,25).	25 27 29
Prin conținutul înalt în proteină, minimizarea nivelului compușilor fenolici cu tendințe de îmbrunare și stabilizarea prin uscare menajantă, substratul nucifer pulverulent reprezintă al doilea produs obținut prin procesarea integrată. Se va ambala în borcane de sticlă brună, de capacitate conform destinațiilor de utilizare, de 500...2000 g, cu denumirea de: "Concentrat proteic nucifer" - produs natural cu indice glicemic scăzut cu utilizări în dietele antidiabetice, în prevenirea cancerului de colon și ca bioprotectiv cardiovascular.	31 33 35
Nivelul de regăsire al proteinei (cu utilizări alimentare) reprezintă minimum 50% din totalul proteinei nucifere procesate.	37
În stare umedă sau deshidratată după neutralizare, concentratul proteic nucifer constituie baza de obținere a izolatului proteic prin solubilizare alcalină.	39
Produsul se solubilizează în proporție de 1:10, cu o soluție de 0,1 M NaOH, timp de 2...3 h, la întineric, la temperatura mediului ambiant, cu agitare lentă.	41
Faza fluidă în care s-au solubilizat proteinele nucifere se separă din reziduul epuizat. În supernatantul fluid se adaugă oțet alimentar de 9%, pentru a realiza un pH de 3,2...4,0 unități pH.	43
Are loc o precipitare rapidă, proteinele se depun la partea inferioară iar partea superioară este reprezentată de un fluid cu o colorație galbenă.	45

RO 131711 B1

1 Produsul ce conține proteinele dispersate se lasă să sedimenteze timp de 6...8 h,
2 pentru consolidarea miceliilor proteice, după care lichidul care cumulează o a doua fracțiune
3 de compuși fenolici hidrofilici, care nu s-au separat complet prin fracționarea acetică inițială,
4 se separă de precipitatul proteic prin filtrare. Sedimentul proteic se usucă menajant în
5 uscătorul cu trepte de temperatură și ventilație cu aer cald, până la un nivel al umidității de
6 maximum 10% și după caz, se mărunțește din nou pentru a obține un produs pulverulent.

7 Prin operațiile de condiționare și solvoliza alcalină, s-a realizat o separare de
8 carbohidrați oligomerici, care au fost reținuți în reziduul insolubil separat în urma extracției
9 alcaline a proteinelor nucifere.

10 Produsul final obținut, prezintă un conținut în proteină (N x 6,25) de minimum
11 60...70%. Poate fi ambalat în borcane de sticlă brună cu capacitate de 250...1000 g, sub
12 denumirea de "Izolat proteic nucifer", cu un nivel echilibrat în aminoacizi esențiali arginina,
13 lizina, histidina, cistina și metionina.

14 Utilizări în suplimente alimentare și alimente funcționale și de asemenea în dietele
15 de tip Vegan.

16 Nivelul de regăsire al proteinei față de proteină existentă în șrotul inițial se cifrează
17 la valori de 22...27%. Izolatul proteic nucifer, alături de utilizările alimentare, constituie un
18 aditiv valoros pentru produse farmaceutice și cosmetice.

19 Avantajele procedurii constau în:

20 1. Dezvoltarea tehnologiilor integrate de recuperare a compușilor naturali cu potențial
21 sanogen din subproduse reziduale nevalorificate în prezent, respectiv șrot nucifer delipidizat.

22 2. Optimizarea procedurilor de recuperare a proteinelor din subproduse cu textură
23 rigidizată.

24 3. Separarea și concentrarea compușilor bioactivi din subproduse deținătoare de
25 antioxidanți naturali, fără utilizarea solvenților nemiscibili cu apa.

26 4. Aplicarea de fluxuri tehnologice cu utilaje accesibile din punct de vedere economic
27 la nivelul unor IMM-uri.

28 5. Separarea și disponibilizarea structurilor proteice ca alternativă accesibilă la
29 procedeele de separare prin membrane de ultrafiltrare.

30 6. Fracționarea bioresurselor reziduale oleaginoase ca alternativă la procedeele
31 enzimatică cu alcalaze și carbohidraze.

32 7. Obținerea de concentrate proteice cu un conținut în proteină de 38...40%, exclusiv
33 prin operații de condiționare și solvoliză în mediu acid moderat.

34 8. Optimizarea nivelului de biofosfor al concentratelor proteice prin micronizarea
35 la dimensiuni de 15...25 microni, fără aplicarea presiunilor foarte înalte.

36 9. Obținerea de izolate proteice prin solvoliza alcalină a concentratului proteic nucifer,
37 rezultând un conținut în proteină de minimum 60...70% și prin precipitarea proteinelor
38 solubilizate în mediu acid moderat, respectiv oțet alimentar de 9%.

39 10. Oportunități de diversificare a utilizării produselor nucifere consecutiv aplicării
40 procedurii integrate, în alcătuirea de suplimente alimentare și alimente funcționale.

41 11. Extinderea utilizării concentratului proteic nucifer cu 38...40% proteină și 20...40%
42 fibre alimentare funcționale, ca produs cu indice glicemic scăzut, cu obținerea de produse
43 antidiabetice, de prevenire a cancerului de colon și a afecțiunilor cardio-vasculare, similitudini
44 cu produsul UBF.

45 12. Extinderea utilizării concentratului și izolatului proteic nucifer în rețeturile de tip
46 Vegan ca alternativă la proteinele de origine animalieră.

Rezumativ din șroturile nucifere delipidizate care până în prezent sunt valorificate exclusiv ca furaje, ca urmare a procesării previzionate conform invenției, s-au obținut extracte nutraceutice hidroacetice cu un conținut relevant în compuși naturali antioxidanți și concentrate și izolate proteice nucifere cu un nivel convenabil de proteine.	1 3
Obținerea acestor produse s-a realizat fără a necesita aplicarea tehnologiilor de ultrafiltrare prin membrane și fără aplicarea de procedee enzimactice, care prezintă dificultăți în menținerea parametrilor de procesare biotehnică la nivel industrial.	5 7
Fluxurile tehnologice pot fi realizate prin achiziția unor utilaje cu nivele investiționale accesibile unor IMM-uri.	9
În perspectivă, actualul procedeu descris în prezenta invenție, deschide paliere de interes în realizarea de alimente funcționale conforme cu tendințele gastronomiei moderne.	11
În obținerea produselor nucifere, conform invenției, s-au luat în considerare aspecte specifice ale componentei matrixului nucifer, care s-au evidențiat pe parcursul experimentelor, comparativ cu alte subproduse oleaginoase rezultate prin procesarea la rece a uleiurilor.	13
O primă referire vizează categoriile de compuși care necesită îndepărtarea din biomasa oleaginoasă reziduală întrucât acești compuși indezirabili imprimă însușiri nedorite în produsul final.	15 17
Șroturile din resursele oleaginoase, de tipul semințelor de rapiță, floarea-soarelui, dovleac, in etc. prezintă ca și compuși indezirabili glicozinolați, acid fitic și catități variabile de fenoli. Fenolii în general sunt reprezentați în aceste resurse în cantități mai mici ca în șroturile nucifere, fiind reprezentați de compuși ca acidul sinapic și de acidul clorogenic.	19 21
Pe de altă parte, un mare avantaj în obținerea de produse nutraceutice din șroturile nucifere, este prezența minimală a amidonului, la valori de maximum 0,2%. Carbohidrații fiind reprezentați de fibre alimentare funcționale, solubile și insolubile S.D.F. și I.D.F. a căror prezență este necesară în alimentație și care conferă produselor finite (prioritar concentratelor proteice) un indice glicemic redus. Acest aspect poate fi deosebit de important în constituirea de produse alimentare funcționale, antidiabetice, de prevenire a cancerului de colon și de prevenire a bolilor cardiovasculare.	23 25 27
De asemenea, s-a remarcat în operațiile de extracție solubilizarea și precipitarea proteinelor, comportarea substratului nucifere este diferită de a altor categorii de șroturi.	29
O solubilizare avansată, necesită un minimum al <i>pH</i> -ului de 10,5 unități <i>pH</i> . Precipitarea solubilizatelor proteice se realizează de asemenea la valori scăzute ale <i>pH</i> -ului, 3,2...4,0 unități <i>pH</i> , dar prezintă avantajul unor precipitate cu separare rapidă și netă de supernatantul fluid.	31 33
Foarte important este și faptul că solubilizarea compușilor fenolici să poată fi realizată în mediu acid moderat, de exemplu cu oțet alimentar de 9%.	35
Comparativ cu etanolul, considerat că solubilizantul de bază al compușilor fenolici, prin utilizarea oțetului alimentar de 9%, se poate obține un nivel de solubilizare al fenolilor de circa 67,7%, comparativ cu o soluție etanolică de 50%.	37 39
Acest aspect poate fi deosebit de important din punct de vedere economic, întrucât se poate obține un extract fenolic integrat într-un produs alimentar tradițional, respectiv oțetul de 9%, care poate constitui astfel o bază de obținere a oțeturilor aromatice și nu necesită operații de distilare, ca în cazul extracțiilor cu alcool etilic.	41 43
Descrierea detaliată a invenției	
În obținerea produselor nucifere, conform invenției, s-au luat în considerare aspecte specifice ale componentei matrixului nucifer, care s-au evidențiat pe parcursul experimentelor, comparativ cu alte subproduse oleaginoase rezultate prin procesarea la rece a uleiurilor.	45 47

O primă referire vizează categoriile de compuși care necesită îndepărtarea din biomasă oleaginoasă reziduală, întrucât acești compuși indezirabili imprimă însușiri nedorite în produsul final.

Șroturile din resursele oleaginoase, de tipul semințelor de rapiță, floarea-soarelui, dovleac, in etc. prezintă ca și compuși indezirabili glicozinolați, acid fitic și catități variabile de fenoli. Fenolii în general sunt reprezentați în aceste resurse în cantități mai mici ca în șroturile nucifere, fiind reprezentați de compuși ca acidul sinapic și de acidul clorogenic.

Pe de altă parte, un mare avantaj în obținerea de produse nutraceutice din șroturile nucifere, este prezența minimală a amidonului, la valori de maximum 0,2%. Carbohidrații fiind reprezentați de fibre alimentare funcționale, solubile și insolubile S.D.F. și I.D.F. a căror prezență este necesară în alimentație și care conferă produselor finite (prioritar concentrațelor proteice) un indice glicemic redus. Acest aspect poate fi deosebit de important în constituirea de produse alimentare funcționale, antidiabetice, de prevenire a cancerului de colon și de prevenire a bolilor cardiovasculare.

De asemenea, s-a remarcat în operațiile de extracție, solubilizare și precipitare a proteinelor, comportarea diferită a substraturilor nucifere față de a altor categorii de șroturi.

O solubilizare avansată, necesită un minim al pH-ului de 10,5 unități pH. Precipitarea solubilizatelor proteice se realizează de asemenea la valori scăzute ale pH-ului, 3,2...4,0 unități pH, dar prezintă avantajul unor precipitate cu separare rapidă și netă de supernatantul fluid.

Foarte important este și faptul că solubilizarea compușilor fenolici să poate fi realizată în mediu acid moderat, de exemplu cu oțet alimentar de 9%.

Comparativ cu etanolul, considerat ca solubilizant de bază al compușilor fenolici, prin utilizarea oțetului alimentar de 9%, se poate obține un nivel de solubilizare al fenolilor de circa 67,7%, comparativ cu o soluție etanolică de 50%.

Acest aspect poate fi deosebit de important din punct de vedere economic, întrucât se poate obține un extract fenolic integrat într-un produs alimentar tradițional, respectiv oțetul de 9%, care poate constitui astfel o bază de obținere a oțeturilor aromatice și nu necesită operații de distilare, ca în cazul extracțiilor cu alcool etilic.

Se vizează obținerea de produse nucifere integrate etapelor de procesare previzionate cu următoarea succesiune a operațiilor de prelucrare:

a. Prepararea extractului nutraceutic hidroacetic din șrotul nucifer delipidizat prin condiționarea șrotului cu structura rigidizată rezultat din presarea la rece a miezului de nucă, care se mărunțește la dimensiuni de 40 Mesh și se spală cu apă deionizată, la un raport de 1:10, pe o durată de 60 min, pentru a îndepărta prin solubilizare în mediu hidrofilic, eventualii compuși de degradare care pot apare consecutiv frecării mecanice în procesul de presare a miezului de nucă.

Compușii cu început de caramelizare imprimă un gust amar, cu tendințe de îmbrunare, și pot fi reprezentați de glicolipidele termosensibile și de zaharurile monozice.

Apele de spălare se îndepărtează prin filtrare iar reziduul umed se supune operației de maceare cu oțet alimentar de 9%, în proporție de 1:10, la temperatura mediului ambiant, timp de 6...8 h, după care faza hidroacetică în care s-au solubilizat compușii fenolici se separă din nou din șrotul remanent.

Supernatantul fluid se lasă la sedimentare timp de 4 h, la rece, la temperaturi cuprinse între 4...8°C pentru a separa eventualele depuneri fine și apoi se decantează, rezultând un produs cu miros caracteristic de nucă și culoare slab gălbuie, cu un conținut în fenoli totali exprimat în echivalenți de acid galic de 2000...2100 mg/l.

În extractul fluid nutraceutic hidroacetic s-au identificat prin analize GC-MS compuși antioxidanți de tipul acizilor fenol carboxilici, respectiv acizii para cumaric, galic, ferulic și elagic precum și flavonoida Kaempherol. De asemenea, pirogolaolul. Prin cromatografie GC-MS s-au identificat compuși mai volatili, respective aldehida vanilică, p-Menth-4-en-3-one, Furylcabinol, Diizobutilftalat, Histren etc.	1
Extractul acetic prezintă caractersitici senzoriale atractive întrucât se regăsesc și aromele caracteristice de nucă. În extractul hidroacetic se regăsesc de asemenea și fibre solubile S.D.F. la nivele de 0,1...0,2 g/l (identificate gravimetric prin precipitare cu izopropanol în raport de 1:1). De asemenea, se regăsesc și substanțele minerale existente în miezul de nucă, în concentrații care depind de caracteristicile diferitelor soiuri nucifere.	3
Prin această componentă complexă, extractul hidroacetic se integrează conceptului de "Produs fluid nutraceutic cu potențial antioxidant".	5
b. Prepararea concentratului proteic nucifer se realizează prin condiționarea reziduului remanent rezultat în urma macerării acetice a șrotului nucifer. Reziduului remanent i se adaugă apa deionizată, la un raport de 1:6...1:10, în două etape de spălare consecutive pentru a îndepărta oțetul alimentar remanent. Durata de spălare cu agitare intermitentă este de 15 min și se realizează în 2 etape consecutive, până la obținerea unui pH în domeniul neutru. Reziduul umed neutralizat se separă prin filtrare de apele de spălare și se usucă menajant în uscătorul cu trepte graduale de temperatură, prin ventilație cu aer cald, până la obținerea unui produs cu umiditate de maximum 10%. Se obține un substrat nutraceutic în a cărui componentă, alături de proteine, se regăsesc fibre alimentare constituite din carbohidrați funcționali, în proporții variabile, de 30...40% și un conținut în proteina brută (N x 6,25) de minimum 38...40%.	7
Concentratul proteic deshidratat poate fi facultativ supus operației de micronizare în moara coloidală uscată, pentru a microniza dimensiunea particulelor, la 25...30 microni. Micronizarea conferă însușiri funcționale superioare și diversificarea utilizărilor în produse compozite. Nivelul de regăsire al proteinelor, comparativ cu proteinele existente în șrotul nucifer, se cifrează la valori de minimum 50%.	9
c. Prepararea izolatului proteic nucifer.	11
Concentratul proteic ca atare, umed, după neutralizare și concentrare, se prelucrează prin solvoliza alcalină pentru a obține izolatul proteic. Se realizează o macerare prin imersarea în soluție de NaOH 0,1 M de puritate adecvată utilizărilor alimentare, la un raport de 1:10, la temperatura mediului ambiant, pe o durată de 2...3 h, cu agitare lentă. Urmează separarea fazei fluide în care s-au solubilizat proteinele nucifere din reziduul remanent, prin filtrare sau centrifugare. Extractul alcalin fluid se precipită cu oțet alimentar de 9% la un pH de 3,2...4,0.	13
Are loc o precipitare rapidă cu depunerea unui precipitat masiv și separarea unei faze fluide cu o colorație gălbuie.	15
Dispersia proteică se lasă la sedimentare pentru a concentra miceliile proteice, timp de 6...8 h, la întuneric, la temperatura de +4°C, după care sedimentul proteic se separă de supernatantul în care a avut loc o a doua solubilizare a compușilor fenolici, care nu au fost îndepărtați complet din biomasa nuciferă, în prima etapă de procesare cu oțet alimentar.	17
Se obține izolatul proteic nucifer cu un conținut în proteina (N x 6,25) de minimum 65...70% (N x 6,25) cu un nivel ridicat de biofolosința metabolică și nutrițională, prin conținutul înalt în aminoacizi esențiali, prioritar arginina, precum și lizina, histidina, și aminoacizii cu sulf, metionina și cistina.	19
Randamentul de regăsire a proteinelor nucifere din totalul proteinelor existente în șrot se cifrează la valori de 22...27%.	21

RO 131711 B1

1 Etape de procesare

Etapa I

3 Șrotul de nucă delipidizat se introduce în utilajul de mărunțire (1), și se mărunțește la dimensiuni medii de 40 Mesh - rezultă șrotul mărunțit.

Etapa II

7 Șrotul mărunțit se introduce în apă deionizată la un raport de 1:10, în vasul de limpezire-condiționare (2), pentru îndepărtarea compușilor indezirabili (glicolipide și zaharuri, cu început de caramelizare), după care dispersia apoasă se separă în filtrul (3), rezultând șrotul condiționat umed și apele uzate cu impurități.

Etapa III

11 Șrotul cu o umiditate de 60...65% este trecut la macerare cu oțetul alimentar de 9%, la un raport de 1:10, timp de 6...8 h, la temperatura mediului ambient, în vasul de macerare
13 (4). În continuare este trecut la o a doua operație de filtrare-separare (3'), rezultând șrotul
15 nucifer umed purificat de fenoli și produsul 1 extractul nutraceutic hidroacetic, cu potențial
antioxidant, care se colectează în vasul de depozitare (5) destinat păstrării produsului I
anterior ambalării.

Etapa IV

17 Șrotul umed se separă de oțetul alimentar remanent de 9%, prin adăugare în 2 etape
19 consecutive, de apă deionizată, la un raport de 1:6, respectiv 1:10, timp de 15 min, pentru
ambele etape, în vasul de neutralizare (6), până la un pH neutru de 6,4...7,0.

21 Urmează o altă separare prin filtrare (3''), rezultând apele de spălare slab acide și
șrotul neutralizat umed.

Etapa V

23 Șrotul umed cu o umiditate de 60...65%, se trece în uscătorul cu trepte de tempe-
25 ratură și ventilație cu aer cald (7).

Rezultă șrotul deshidratat cu o umiditate de maximum 10%.

Etapa VI

27 Șrotul deshidratat se trece în moara coloidală uscată (8), unde se micronizează la
29 dimensiuni de 15...25 microni.

31 Rezultă produsul 2. " Concentrat proteic nucifer, cu un conținut în proteină brută de
minimum 38...40%, fibre alimentare funcționale 40%, fibre celulozice 2...3%.

Etapa VII

33 Concentratul proteic se solubilizează în vasul de solubilizare (9), cu o soluție de
NaOH 0,1 M, La un raport de 1:10, pe o durată de 2...3 h, la temperatura mediului ambient.

35 Urmează o nouă separare prin filtrare (3'''), din care rezultă un reziduu insolubil și
solubilizatul proteic alcalin

Etapa VIII

37 Solubilizatul proteic alcalin se precipită cu acid acetic de 9% la un pH de 3,2...4,0, în
39 vasul de precipitare (10), rezultând un sediment proteic și un supernatant în care s-au
solubilizat complementar compușii fenolici care nu au fost complet solubiliizați în faza de
41 extracție acetică.

43 În vasul de precipitare (10) se lasă la sedimentare timp de 6...8 h, la 4°C, pentru a
facilita formarea micelilor proteice, după care urmează o altă operație de separare prin
filtrare (3'''), a sedimentului proteic de fază fluidă.

Etapa IX

45 Sedimentul proteic cu o umiditate de 60...70%, separat de faza fluidă, se trece la
47 uscătorul în trepte și ventilație cu aer cald, unde se usucă până la o umiditate de maximum
10%.

RO 131711 B1

Rezultă produsul 3 izolat proteic nucifer, cu un conținut în proteină de minimum 65...70% (N x 6,25) și cu un nivel de regăsire a proteinei față de proteina din șrot de 22...27%.	1
Utilaje:	3
- moara cu potențial de maruntire mediu - 40 Mesch;	5
- vas de condiționare-limpezire primară a șrotului nucifer;	
- utilaj de separare-filtrare (operații de filtrare-separare) (3', 3", 3"', 3''');	7
- vas de macerare hidroacetică;	
- vas de depozitare a produsului I Extract nutraceutic hidroacetic cu potențial antioxidant;	9
- vas de neutralizarea șrotului purificat de compuși fenolici;	11
- uscător cu aer cald și ventilație în trepte de temperatură;	
- moară coloidală uscată pentru micronizare la dimensiuni de 15...25 microni. Produs II Concentrat proteic nucifer pulverulent cu indice glicemic scăzut și conținut în proteină de minimum 38...40%;	13
- vas de solubilizare a concentratului proteic pentru a obține izolatul proteic;	15
- vas de precipitare a proteinelor la pH 3,2...4,0, de asemenea pentru sedimentare la temperatura de + 4°C. (7') - Instalație de uscare a sedimentului proteic umed cu umiditate maximă de 10%, Produs III Izolat proteic nucifer cu 65...70% proteina (N x 6,25), nivel de recuperare a proteinei din șrotul inițial de 22...27%.	17
- utilaje de ambalare, etichetare a produselor I, II și III.	19
	21
Schema generală de procesare	23
Șrot nucifer delipidizat în urma procesării la rece a uleiului de nuca, ca baza de obținere a produselor 1, 2, 3 cu următoarea compoziție medie:	25
Proteina 42...47%	27
Carbohidrați funcționali 37...42%, I.D.F. și S.D.F.	
Fibre solubile S.D.F. 0,1...0,4%	29
Ulei remanent 7 -9% - antioxidanți lipofdici	
Compuși fenolici antioxidanți hidrofilici	31
Substanțe minerale caracteristice biomasei nucifere	33
Măruntire la 40 Mesh	
Utilaj Moară cu nivel de măruntire mediu (I).	35
Șrot nucifer mărunțit	37
Se prelucrează cu apă deionizată 1:10	
Agitare lentă 60 min, în vasul de amestecare (2)	39
Separare - filtrare - filtru (3); Rezultă ape uzate 1	41
Șrot nucifer limpezit	43
Umiditate 60...65%	
Se prelucrează cu oțet alimentar de 9%, raport 1:10	45
Măcerarea acetică 6...8, în vasul de macerare (4).	
Separare - filtrare Filtru (3')	47

RO 131711 B1

Şrot nucifer purificat de fenoli
Produs I
Extract nutraceutic hidroacetic
Fenoli totali 2000...2100 mg/ml; fibre solubile 0,1...0,2 g/l
Substanţe minerale
Se procesează cu apa deionizată 1:6...1:10, în 2 etape consecutive

Vas de depozitare al produsului I - (5)
Neutralizarea oţetului la pH 6,4 în două etape consecutive a 15 min, în vasul de neutralizare (6).

Filtrare - separare (3")
Rezultă ape de spălare uzate 2.

Şrot nucifer neutralizat
Umiditate 60...65%
Uscare în uscătorul cu trepte de temperatură şi cu ventilaţie cu aer cald. Utilajul nr. (7)

Şrot deshidratat
Umiditate maximum 10%
Micronizare în moara coloidală uscată la 15...25 microni. - Utilajul nr. (8)

Produs II. - Concentrat proteic cu minimum 38...40% proteina,
Conţine 40% carbohidraţi funcţionali, fibre alimentare I.D.F.
Fibre celulozice
Nivel de regăsire al proteinei din proteina introdusă la prelucrare minimum 50%

După obţinerea produsului concentrate proteic nucifer, urmează etapele complementare de obţinere a izolatului proteic nucifer cu următoarea succesiune de operaţii.

Concentratul proteic nucifer umed sau deshidratat se procesează în continuare cu soluţie de NaOH 0,1 M la raportul de 1:10

Solubilizare alcalină 2...3 h, în vasul de solvoliză alcalină (9).
Separare - filtrare (3").
Rezultă reziduul nucifer insolubil.

Solubilizat proteic fluid
Se prelucrează cu oţet alimentar de 9%

Utilaj vas de precipitare-sedimentare (10).
Precipitare la pH egal cu 3,2...4,0.
Sedimentare la 4°C, timp de 6...8 h.
Separare - filtrare (3").
Rezultă ape uzate cu fenoli reziduali.

Sediment proteic cu 60 -70 % umiditate

Uscare pe uscătorul în trepte cu ventilație și aer cald (7').	1
Produs III Izolat proteic cu umiditate de maximum 10%, proteina minimum 65...70% (N x 6,25)	3
	5
Randament de regăsire față de proteina din șrotul nucifer introdusă la prelucrare 22...27%.	7
Bibliografie	9
1. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (<i>Juglans regia</i> L.); Zijia Zhang, Liping Liao, Jeffrey Moore, Tao Wu, Zhengtao Wang, Food Chemistry, 113, (2009), 160-165.	11
2. US 6395261 B1/May 28, 2002, Walnut seed meal extract by Jean Pierre Laforet.	13
3. US 7820226 B2/Oct. 26,2010. Production of flax protein isolate by Brent Everett Green, Ronald W. Martens, Johann Franz Tergesen, Radka Milanova.	15
4. United States Patent Application Publication; Pub.No. US 2011/0104348 A1, May 5, 2011 Canola protein isolate functionality by E.Donald Murray.	17
5. Optimization of the Aqueous Enzymatic Extraction of Rapeseed Oil and Protein Hydrolysates: Shao Bing Zhang, Zhang Wang, Shi Ying Xu, J Amer Oil Chem Soc (2007), 84; 97-105.	19
6. A Return to Natural - The Elimination of Solvent Extraction from the Production of Oilseed Protein Isolates BioExx , November 19, 2011, David T. Balke PhD.	21
7. Claudia Pickard, Peter Fisner, Stephanie Rader, "Protein preparation Producer from rape seeds, USA 0301074 A1, 8 decembrie 2011.	23
8. The content of phenolic substances and sunflower protein functionality, Tamara Nosaenko, Valeriy Mank Anastasiya Lebid,3rd North and East European NEEFOOD, Congress on Food, Global and Local Challenges în Food Science and Technology , Brașov, România, 20 to 23 may, 2015.	25
9. United States Patent No. US 8,309,159 B1 /Nov. 13, 2012, Process for obtaining legume protein fractions of moderate molecular weight, legume protein fractions and use thereof by Martin Lotz, Gerold Eggengoor.	27
10. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality; M. jarpa Parra, F. Bamdad, Y. Wang, Z. Tian, F.Temelii, Jay Han, L.Chen, Food Science and Technology, 57, (2014), 461-469.	29
11.United States Patent No. US 8,309,145 B2 / Nov. 13, 2012, Treatment of vegetation liquors derived from oil-bearing fruit by Ravigadevi Sambanthamurthi, Yew Ai Tan, Kalyana Sundram.	31
12. Effect of organic acid pretreatment on some physical, funcțional, and antioxidant properties of flour obtained from three unripe banana cultivars.; Tonna A. Anyasai, Afam I. O. Jideani, Godwin R. A. Mchau, Accepted Manuscript, Food Chemistry, 09.2014.	33
13. Effect of micronization technology on physicochemical and antioxidant properties of dietary fiber from buckwheat hulls; Fengmei Zhu, Bin Du, Runfeng Li, Jun Li, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3, (2014), 30-34.	35
14. High - pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins, P. Garcia-Mora, E. Penas, J. frias, R. Gomez C. Martinez-Villaluenga, Food Chemistry, 171, (2015), 224-232.	37
	39
	41
	43
	45
	47

Revendicări

1. Procedeu integrat de disponibilizare a proteinelor și a antioxidantilor hidrofiliți din subproduse nucifere, **caracterizat prin aceea că**, se mărunțește șrot nucifer rezultat în urma presării la rece a uleiului de nucă la dimensiuni de 40 Mesh într-o moară cu nivel mediu de mărunțire (1), se introduce într-un vas de condiționare - limpezire (2) cu apă deionizată la un raport de 1:10, se agită lent timp de 60 min, se îndepărtează apele de spălare uzate prin filtrare într-un filtru (3), rezultând un șrot nucifer purificat cu o umiditate de 65...70%, care se introduce într-un vas de macerare acetică (4), unde se lasă la macerat 68 h, cu oțet alimentar de 9%, la un raport de 1:10, la temperatura mediului ambiant, cu agitare intermitentă, apoi se separă din nou faza fluidă prin filtrare într-un filtru (3'), obținându-se extractul acetic nucifer care se colectează într-un recipient de depozitare (5) la întuneric la o temperatură de maximum 25°C, șrotul hidroacetic nucifer remanent obținut prin macerarea cu oțet alimentar de 9% se neutralizează prin spălare cu apă deionizată în raport de 1:6...1:10, în două etape consecutive a câte 15 min fiecare, într-un vas de neutralizare (6), până la obținerea unui pH neutru de 6,4...7, apoi se separă șrotul neutralizat de apele de spălare uzate slab acide, rezultând șrotul nucifer neutralizat prin separare într-un filtru (3'') cu o umiditate de 65...70%, care se usucă menajant într-un uscător cu trepte de temperatură și ventilație cu aer cald (7), până la un nivel al umidității de maxim 10%, urmat de operația de micronizare la dimensiuni de 15...25 μ, într-o moară coloidală uscată (8), rezultând concentratul proteic nucifer, care, ulterior se imersează într-un vas de solubilizare (9), cu o soluție de 0,1 M NaOH, la un raport de 1:10, la întuneric, la temperatura mediului ambiant, preferabil nu mai mare de 25°C, timp de 2...3 h, cu agitare lentă, după care dispersia se separă într-un filtru (3'''), rezultând un reziduu nucifer epuizat și un solubilizat proteic care se trece într-un vas de precipitare (10), unde se precipită proteinele nucifere la un pH de 3,2...4,0 și se lasă la sedimentare 6...8 h, pentru consolidarea depunerii miceliilor proteice la temperatura de 4°C, după care sedimentul proteic se separă din nou într-un filtru (3'''), rezultând ape uzate în care s-au solubilizat complementar și compușii fenolici reziduali care nu s-au solubilizat complet în etapa fracționării acetice, și sedimentul proteic cu o umiditate de 65...70%, care se usucă menajant într-un uscător cu ventilație și aer cald în trepte de temperatură (7''), produsul obținut se trece la o instalație de dozare și etichetare (11).

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, extractul acetic rezultat din șrotul nucifer este un produs fluid cu însușiri antioxidante având un conținut în fenoli totali de 2000...2100 echivalenți acid galic, reprezentați de acidul paracumaric, ferulic, galic, clorogenic, kaempferol, de unii compuși volatili: aldehida vanilică, para-menth-4-en-3-one, fural carbinol, diizobutyltalat, histren etc, de fibre alimentare solubile 0,1...0,2 g/l, și reprezintă o bază de obținere a diverselor oțeturi aromatice, de băuturi tonice cu potențial antioxidant hidrofiliț, sau ca bază de aseasonare a preparatelor compozite la nivele de 1,5...5% întrucât prezintă însușiri senzoriale atractive datorate aromelor nucifere, precum și însușiri sanogene datorită capacităților bioprotective de inhibare a radiațiilor UVB și a speciilor radicalice poluante ale oxigenului și ale azotului.

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, concentratul proteic nucifer are un conținut în proteină de 40% (N x 6,25), un conținut în carbohidrați funcționali prioritar fibre alimentare insolubile de 38...40% și fibre celulozice la un nivel variabil, prezentând un indice glicemic scăzut și un conținut echilibrat în aminoacizi esențiali: arginină, lizină, histidină, cistină și metionină, prezintă însușiri anticolesterolemice,

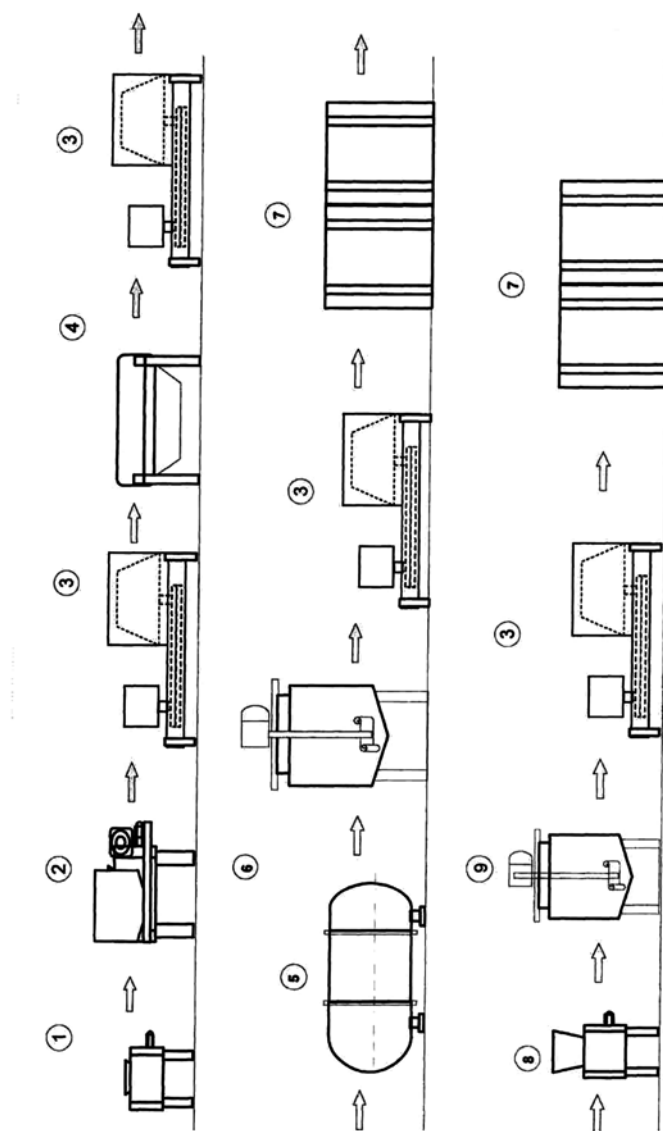
RO 131711 B1

antiobezogene, cu potențial de constituire a unor suplimente alimentare și/sau a unor alimente funcționale fitoterapeutice, antidiabetice, de prevenire a cancerului de colon și a afecțiunilor cardiovasculare.	1
	3
4. Procedeu conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că , izolatului proteic nucifer are însușiri tonifiante, prin conținutul în proteină de minim 65...70% (N x 6,25), un nivel înalt de biofolosință metabolică și utilizări preferențiale în alcătuirea de produse alimentare de tip vegan, ca alternativă pentru proteinele de origine animală.	5
	7

(51) Int.Cl.

A23J 1/14 (2006.01),

C07K 1/14 (2006.01)



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 16/2021