



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 01094**

(22) Data de depozit: **12/12/2018**

(41) Data publicării cererii:
28/06/2019 BOPI nr. **6/2019**

(71) Solicitant:
• **ROM HONEY GROUP SRL**,
STR. GRĂDINARI, NR. 1, IMOBIL C1/0/1,
CAMERA 3, IAȘI, IS, RO

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

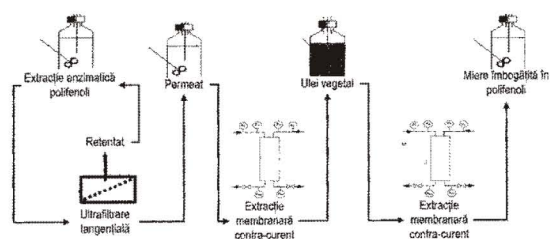
• **NICHITEAN ANDRA LAVINIA**,
STR. STEJAR, NR. 113, IAȘI, IS, RO;
• **CONSTANTINESCU-ARUXANDREI**
DIANA, *ȘOS. MIHAI BRAVU, NR. 297,*
BL. 15A, SC. A, ET. 1, AP. 5, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **STOICA RUSANDICA**,
STR. CPT. GHEORGHE DECUSEARĂ
NR. 10A, BL. E2B, SC. 1, AP. 9, TECUCI,
GL, RO

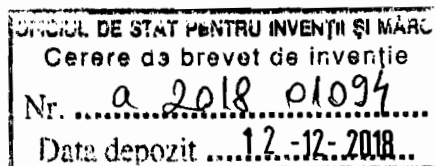
(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A MIERII ÎMBOGĂȚITE ÎN POLIFENOLI ȘI COMPOZIȚIE REZULTATĂ DIN ACESTA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a mieri îmbogățite în polifenoli proveniți din material vegetal și la o compoziție rezultată prin aplicarea acestui procedeu. Procedeu conform invenției are următoarele etape: măcinarea umedă a materialului vegetal și amestecarea acestuia cu apă, adăugarea unui amestec de enzime, alcătuit din hidrolaze care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular și feruloil-esteraze, urmată de extragerea asistată enzimatic a materialului vegetal în apă, ultrafiltrarea tangențială continuă a amestecului de material vegetal - apă - enzimă, începând din ora a doua, cu întoarcerea reținutului în masa de extracție asistată enzimatic, extracția în contracurent lichid - lichid pe contactor membranar a permeatului extras, reextracția uleiului vegetal în care s-au extras polifenolii în contra-curent lichid - lichid pe contactor membranar, față de mierea care se dorește a fi îmbogățită în polifenoli, recuperarea mieri îmbogățite în polifenoli, recuperarea uleiului vegetal pentru reutilizarea acestuia într-un nou ciclu de extracție și trimiterea la compostare a materialului vegetal extras. Compoziția conform invenției are un conținut de polifenol de cel puțin 600 mg echivalent acid galic/kg de miere și o activitate antioxidantă TEAC, de stingere a radicalului anionic ABTS, 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) de cel puțin 300 echivalent μmol trolox/100 g de miere.

Revendicări: 8
Figuri: 1





PROCEDEU DE OBTINERE A MIERII ÎMBOGĂȚITE ÎN POLIFENOLI ȘI COMPOZIȚIE REZULTATĂ DIN ACESTA

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a mierii îmbogățite în polifenoli proveniți din material vegetal, și la o compoziție, rezultată prin aplicarea acestui procedeu, de miere și polifenoli bioactivi antioxidanți, care este destinată utilizării ca aliment funcțional sau ca ingredient activ în cosmeceutice sau dispozitive medicale pentru tratamentul rănilor superficiale.

Sunt cunoscute diferite procedee prin care mierea este îmbogățită în ingrediente biologice active extrase din plante. Mierea, datorită obținerii din materii prime de origine vegetală, respectiv din nectar și polen sau din mană, include compuși fitochimici cu rol semnificativ în menținerea și ameliorarea stării de sănătate. Polifenolii, denumire generică în care sunt incluși și flavonoizii și acizii fenolici, sunt o categorie importantă de astfel de compuși fitochimici. Polifenoli au fost implicați în producerea efectelor benefice constatate în cazul utilizării mierii pentru o serie de boli degenerative: boli cardiovasculare, diabet, cancer, boli neurodegenerative (a se vedea aici de ex. review-ul Hossen et al. 2017, *Pharmacological Reports*, 69, 1194-1205). De asemenea polifenolii au un rol demonstrat în efectul anti-microbian al mierii. Studii recente au dovedit că mierea de mană cu un conținut ridicat de polifenoli are un efect anti-microbian similar cu cel al mierii de hanuka și kanuka (Bucekova et al. 2018, *Scientific reports*, 8, 9061). Amplificarea efectului polifenolilor din miere de către alte ingrediente active determină creșterea activității anti-bacteriene, mai ales față de microorganismele patogene din tubul digestiv (Imtara et al. 2018, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, Article ID 7842583; Bellik & Selles 2017, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11, 111-118). În același timp polifenolii acționează și pentru favorizarea dezvoltării bacteriilor benefice din tubul digestiv (Das et al. 2015, *LWT-Food Science and Technology*, 61, 244-250), datorită acțiunilor respectivelor polifenoli ca prebiotice metabolice (Gibson et al. 2017, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14, 491-502). În special acizii fenolici (de ex. acid ferulic sau acidul *p*-cumaric) au un rol semnificativ în această acțiune selectivă, de inhibare a bacteriilor patogene și de stimulare a bacteriilor benefice din tubul digestiv (Pacheco-Ordaz et al. 2018, *Letters in applied microbiology*, 66, 25-31).

Întrucât conținutul de polifenoli din miere s-a dovedit a fi un marker clar al calității mierii, brevetul AU 2009337192 B2 descrie o serie de metode de analiză a mierii prin care, prin determinarea conținutului de polifenoli, se determină vechimea mierii, fortifierea cu

diverși aditivi, regiunea din care derivă mierea, speciile de plante din al căror nectar / mană a fost produsă mierea și dacă mierea a fost încălzită semnificativ în timpul procesării.

Mierea este un produs natural extrem de complex, un amestec de molecule cu o mare diversitate structurală și funcțională. Fructoza și glucoza, provenite din soluțiile de origine vegetală, nectar sau mană, sunt concentrate în fagurii din stup până la circa 82% substanță uscată. În această soluție suprasaturată, apa liberă este în cantitate foarte mică. Sistemul acesta molecular, atât de aglomerat în zonele cu apă liberă, determină formarea unor complexe proteine – polifenoli, în care se manifestă predominant caracterul pro-oxidant al formelor chinonice ale polifenolilor (Brudzynski et al. 2013, *PLoS One*, 8(8), e72897). Respectiv cele complexe polifenoli – proteine se asociază în particule coloidale. Desfacerea acestor particule coloidale complexe, care includ proteine biologic active, ca defensina și glucozoxidaza, complexate reversibil cu polifenoli, în nanostructuri bioactive se realizează prin diluarea mierii la utilizare și esențială pentru manifestarea activității biologice specifice mierii, ca de ex. activitatea anti-microbiană (Brudzynski, et al. 2017, *Scientific reports*, 7(1), 7637). Îmbogățirea mierii necesită deci introducerea polifenolilor exogeni fortifianti în acel spațiu molecular aglomerat, cu apă liberă în cantitate redusă, în care sunt formate particulele coloidale implicate în activitatea biologică a mierii.

Principala problemă tehnică în cazul îmbogățirii mierii cu ingrediente extrase din materia primă vegetală este omogenizarea componentelor nou introduse într-un material cu vâscozitate ridicată, în care difuzia este limitată, pentru a ajunge în spațiul molecular în care este disponibilă apa liberă și se formează particulele coloidale.

O problemă tehnică derivată este cea a menținerii activității apei în miere în limitele necesare menținerii stabilității microbiologice. Creșterea activității apei înspre limita de 60% favorizează fermentația prin dezvoltarea drojdiilor osmofile spoliatoare (Chirife et al. 2006. *Journal of Food Engineering*, 72(3), 287-292), deci activitatea apei trebuie menținută sub pragul de 50%, corespunzător unei concentrații de max. 17,2% apă în miere.

Cererea de brevet EP3085356 A1 descrie un procedeu de obținere a mierii cu extracte de plante, în care difuzia ingredientelor extrase este favorizată de amestecarea mierii cu solvenți organici. Procedul include următoarele etape: extracția materialului vegetal, întreg sau măcinat, uscat sau proaspăt, cu un solvent organic; separarea părților de plante rămase neextrase de extractul lichid prin presare și filtrare; adăugarea mierii în extractul de plante, într-o proporție variind de la 10 la 90% în greutate, cu agitare continuă; îndepărtarea excesului de solvent din amestecul de miere și extract de plante prin distilare sub vid la o temperatură sub 60°C, cu amestecare constantă, până când conținutul de apă

din miere este sub 20%. Compoziția rezultată este alcătuită din extracte din muguri de conifere, genurile *Picea*, *Abies* sau *Pinus*, sau din extracte de plante medicinale - echinacea, sunătoare, roiniță, mentă, cimbru, salvie sau coajă de banane pentru gătit. Solvenții folosiți sunt etanol, propanol, izopropanol, acetat de etil, acetonă, propan sau hexan. În cazul procedurii descrise de cererea de brevet EP3085356 A1 omogenizarea este favorizată de folosirea soluțiilor de solvenți organici. Solvenții organici, în special cei miscibili cu apa, pot afecta stabilitatea particulelor coloidale și a complexelor proteine – polifenoli. Solvenții organici, propan sau hexan, care ar afecta mult mai puțin stabilitatea particulelor coloidale, pentru că nu ar influența disponibilitatea apei libere, au însă o acceptanță redusă din partea consumatorilor și nu pot fi utilizați pentru procesarea produselor ecologice / organice. De asemenea, procedeul prezintă dezavantajul utilizării unei etape de încălzire, care este consumatoare de energie și care favorizează formarea hidroxi-metil-furfural, HMF, un compus considerat ca reducând calitatea mierii (Shapla et al. 2018. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 35).

Cererea de brevet WO 2017053708 A1 prezintă un procedeu de obținere a unei compoziții de miere îmbogățită cu componente vegetale prin infuzare. Mierea utilizată are un conținut de umiditate de 15% până la 19% (g/g). Procedeul include adăugarea unui materialului vegetal de infuzare la miere pentru a forma o compoziție de miere infuzată / îmbogățită în ingrediente active vegetale. Mierea poate fi uscată înainte de adăugarea materialului de infuzare, după adăugarea materialului infuzare sau atât înainte, cât și după adăugarea materialului de infuzare. Materialul de infuzare este un extract apos sau un suc extras prin presare, din fructe, semințe, pielețe, tulpini, rădăcini sau frunze. În acest caz omogenizarea este favorizată de aplicarea unei soluții apoase. Riscul de fermentare este ridicat, inclusiv datorită faptului că mierea inițială are un nivel de umiditate de peste 17,2%. Reconcentrarea / uscarea mierii, necesară pentru menținerea stabilității microbiologice, este consumatoare de energie, produce HMF și determină denaturarea proteinelor co-implicate în acțiunea anti-microbiană a polifenolilor (Kwakman & Zaat, 2012, *IUBMB life*, 64, 48-55).

Cererea de brevet RU 2013156750 (A) se referă la un procedeu de obținere prin agitare viguroasă a unui produs care conține: miere – 96%, păstură - 2,0% și extract alcoolic din plante - 2,0%. Extractul alcoolic este reprezentat de extract de rădăcini de lemn dulce, de boabe de păducel, de semințe de silimarină, de plante de oregano, de rădăcină de brusture sau de mătase de porumb. Procedeul nu se poate aplica decât la proporții mici de extract în miere, iar folosirea alcoolului etilic afectează stabilitatea particulelor coloidale și a complexelor proteine – polifenoli și limitează utilizarea produsului rezultat final.

Cererea de brevet RO 130739 A0 prezintă un procedeu de îmbunătățire a activității antioxidante a mierii. Procedeu constă în extragerea compușilor activi din afine de pădure liofilizate, după care extractul hidro-alcoolic antocianic este concentrat la vid și amestecat în miere de salcâm monofloră, într-o cantitate de 1 ... 10%, produsul rezultat având un conținut total de antociani totali de 8,6...74,8 mg / 100 g, de polifenoli totali de 41 ... 185,7 mg / 100 g și o activitate antioxidantă totală de 3 ... 22,8 mg echivalent acid ascorbic / 1 ml de produs. Dezavantajul procedurii rezultă din faptul că extractul de afine folosit este un extract total, care are un conținut foarte ridicat de oligo- și monozaharide provenite din afine. Omogenizarea extractului crud total de afine în miere este relativ dificil de realizat, datorită prezenței acestor oligo- și monozaharide în cantitate mare. Introducerea unei cantități semnificative de componente străine în miere afectează stabilitatea particulelor coloidale și a complexelor proteine – polifenoli.

Solvenți alternativi pentru extracția polifenolilor din materialul vegetal sunt uleiurile vegetale (Yara-Varón et al. 2017. *Molecules*, 22(9), 1474). O astfel de soluție, de utilizare a uleiului vegetal ca solvent alternativ la solvenții organici de tipul hexanului, este descrisă în brevetul US 7557146 B, pentru a extrage licopenul din diferite produse obținute prin procesarea tomatelor. O astfel de soluție tehnică, în care se utilizează uleiuri vegetale ca solvent pentru polifenoli, nu a fost însă utilizată pentru îmbogățirea mierii.

Mierea este considerată un exemplu de produs biologic care are caracteristici de solvent din componente naturale care exprimă un efect eutectic semnificativ – NaDES, **Natural Deep Eutectic Solvent** (a se vedea de ex. Liu et al. 2018, *Journal of natural products*, 81, 679-690). Denumirea de eutectic provine de la cuvântul grecesc *eútēktos* care semnifică ușor de topit, și se referă la efectul de reducerea a temperaturii de topire a unor amestecuri de substanțe, care apare în cazul interacției dintre doi sau mai mulți compuși, aflați în amestec în rapoarte molare bine determinate.

Solvenții eutectici sunt cunoscuți pentru capacitatea lor de a solubiliza polifenoli (Ruesgas-Ramón et al. 2017. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65, 3591-3601). Brevetul SUA 9 441 146 B include mierea ca unul din exemple de solvenți eutectici care pot fi utilizați pentru extragerea materialelor biologice, dar nu revendică utilizarea mierii pentru extracția polifenolilor din material vegetal, revendicând alți solvenți eutectici asemănători – ca de ex. lactoză, glucoză și apă într-un raport molar de 5:1:2 sau acid malic acid, alanină și apă într-un raport molar de 1:1:3. Solvenții eutectici au fost utilizați și pentru a extrage polifenolii din uleiurile vegetale (García et al. 2016. *Food chemistry*, 197, 554-561).

Extracția materialului vegetal direct în miere este revendicată de cererea de brevet CN 107836684 A. Procedul descris de această invenție implică recoltarea materialului vegetal, respectiv flori, și îndepărtarea impurităților, uscarea și măcinarea florilor, adăugarea pulberii de flori la miere și încălzirea la 110-115°C, efectuarea unei scurte agitări, timp de 10-60 s, urmată de răcirea rapidă la temperatura camerei și macerarea la temperatura camerei timp de 7 zile. Separarea mierii de materialul vegetal se face prin încălzire și filtrare. În final mierea îmbogățită cu extracte din flori este uscată la 40-60°C, până când conținutul de apă este de 20-22% și greutatea specifică este de 1,32-1,34. Produsul final păstrează aroma specifică a diferitelor tipuri de flori și include fitonutrienți valoroși pentru menținerea stării de sănătate a omului. Etapele de încălzire repetată afectează stabilitatea particulelor coloidale și a complexelor proteine – polifenoli și favorizează producerea de HMF. Iar etapa de filtrare, destinată să înlăture materialul vegetal fin măcinat, reduce semnificativ și conținutul de polen din miere. Polenul este însă un indicator de calitate pentru miere, deoarece conferă o valoare biologică suplimentară mierii și este esențial pentru a verifica originea botanică și geografică a mierii (Bogdanov et al. 1999. *Bee world*, 80, 61-69), deci reducerea conținutului de polen din miere reprezintă un alt dezavantaj al acestui procedeu.

Sunt cunoscute și o serie de procedee prin care mierea este amestecată direct cu diferite materii prime vegetale, care sunt lăsate apoi să se macereze în miere. Invenția se referă la un supliment alimentar pe bază de miere. Cererea de brevet RO 132420 A0 descrie un produs constituit din 74 ... 97% miere și, pentru restul, polen uscat și / sau propolis și eventual pulberi și tincturi de plante medicinale selectate dintre *Chlorella*, *Spirulina*, lucernă, grâu verde, orz, ovăz, floare-pasiunii, hamei, rădăcină de valeriană, lavandă, cuișoare, pelin, menta, oregano, cimbru, cătină, curcuma, eucalipt, ulei esențial de levănțică, mentă sau ceai. Brevetul RO 120683 B1 revendică un produs constituit din 30 ... 50 părți în greutate granule proaspete de polen entomofil care nu sunt tratate termic și 50 ... 70 părți în greutate miere de albine tratată termic, care se obține prin macerarea polenului în miere timp de 7 ... 8 zile, la o temperatură cuprinsă între 10 și 25°C. Dezavantajul comun al acestor procedee de macerare cu lăsarea materialului vegetal în miere este asociat reducerii stabilității mierii ca urmare a introducerii unor hidrocoloizi (fibre vegetale) în cantitate mare. Hidrocoloizii sunt cunoscuți pentru capacitatea lor de a funcționa ca absorbantți de umiditate în amestecurile de dizaharide cu apă (Van der Sman, 2013. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 186-194). Absorbția de apă din atmosferă determină creșterea activității apei și reducerea stabilității microbiologice. În plus, materialul vegetal lăsat în miere modifică aspectul și gustul mierii, ceea ce determină o reducere a acceptanței de către consumatori.

O soluție alternativă la încălzire, pentru intensificarea procesului de difuzie în fluide foarte vâscoase, ca de ex. miere / NaDES, este utilizarea ultrasunetelor (Zhou, et al. 2018. *Industrial Crops and Products*, 120, 147-154). Brevetul US 4050952 protejează un procedeu care utilizează ultrasunete pentru procesarea mierii. Prin acest procedeu se inhibă cristalizarea și fermentarea mierii, expunându-se mierea la radiații ultrasonore cu frecvență de 18.000-20.000 Hertz sau mai mare, într-un interval de temperatură cuprins între 50 și 100°F (de la 10°C la 37,78°C), pentru mai puțin de 5 minute. Expunerea la ultrasunete nu numai că inhibă cristalizarea și fermentarea mierii, distrugând majoritatea drojdiilor spoliatoare, dar crește semnificativ și fluiditatea acesteia (Subramanian et al. 2007. *International Journal of Food Properties*, 10, 127-143). Nu au fost brevetate încă procedee prin care să fie intensificată extracția și/sau difuzia în miere a ingredientelor bioactive extrase din plante, inclusiv polifenoli, prin folosirea ultrasunetelor.

Polifenolii, și în special a acizii fenolici, sunt legați / trapați în materialul vegetal, fiind necesare diferite tehnici pentru facilitata eliberarea lor în solvenți. Hidrolazele specifice diferitelor componente ale materialului vegetal s-au dovedit printre cele mai eficiente mijloace în asistarea extracției diferitelor bio-molecule (Nadar et al. 2018, *Food Research International*, 108, 309-330). Cererea de brevet WO2015082191 A1 revendică utilizarea cutinazei, inclusiv împreună cu surfactanți neionici alcoxilați și hidrocarburi saturate, pentru a crește extractabilitatea polifenolilor din frunzele de ceai. Enzimele pectinolitice au fost folosite pentru a crește extractabilitatea polifenolilor din struguri, sămburi de struguri sau boască struguri – cererea de brevet WO2007038685 A2. Extracția polifenolilor din frunzele de căpșun a fost amplificată prin utilizarea celulezelor (cerere de brevet CN 102924536 A). Un amestec de pectinaze, hemicelulaze și proteaze a crescut de peste 20 ori cantitatea de polifenoli extrasă din șrotul de in (Ribeiro et al. 2013, *ISRN biotechnology*, 2013. Article ID 521067). Nu sunt cunoscute încă procedee prin care să se elibereze din material vegetal polifenoli, inclusiv flavonoizi sau acizi fenolici, care să fie extrași apoi în miere. Disponibilizarea polifenolilor din matricea extracelulară este necesară în special pentru acizii fenolici, care s-au dovedit a avea o acțiune anti-microbiană selectivă, inhibând bacteriile patogene din sistemul digestiv și favorizând dezvoltarea bacteriilor benefice.

O problemă tehnică suplimentară atunci când sunt eliberați polifenolii (flavonoizi, acizi fenolici) din materialul vegetal, sub acțiunea enzimelor hidrolitice, este cea a solubilității lor reduse în mediu apos, la pH neutru / acid. Apa este necesară în cantități semnificative pentru reacțiile de hidroliză, iar polifenolii amfifili / hidrofobi pot ajunge rapid în apă la concentrații

apropiate de limita lor de solubilitate. Acest fapt poate duce la reducerea eficienței de extracție asistată enzimatic.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu prin care să se disponibilizeze și să se extragă polifenolii din materialul vegetal și apoi să se omogenizeze în miere, fără ca să fie afectate particulele coloidale care includ polifenolii bioactivi și fără ca separarea materialului vegetal să influențeze conținutul de polen.

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- ✓ Măcinarea umedă a materialului vegetal și amestecarea cu apă;
- ✓ Adăugarea unui amestec de enzime, alcătuit din hidrolaze care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular și feruol-esteraze, urmată de extragerea asistată enzimatic a materialului vegetal în apă, timp de 5 ore la temperatura de 55-60°C și pH 6.0;
- ✓ Ultrafiltrarea tangențială continuă a amestecului de material vegetal – apă – enzimă, începând din ora a 2-a, cu întoarcerea retentatului în masa de extracție asistată enzimatic;
- ✓ Extracția în contracurent lichid-lichid pe contactor membranar a permeatului, cu ulei vegetal, la temperatura de 45°C, cu reîntoarcerea în masa de permeat a permeatului extras, la 90 min după începerea extracției enzimatice, timp de 5 ore;
- ✓ Re-extracția uleiului vegetal în care s-au extras polifenolii în contra-curent lichid-lichid pe contactor membranar, față de mierea care se dorește a fi îmbogățită în polifenoli, care începe la 2 ore min după începerea reacției enzimatice;
- ✓ Ultrasonicarea repetată, câte 3 min la fiecare 30 min, cu o putere de 400 W, a mierii în care se face extracția uleiului vegetal îmbogățit în polifenoli;
- ✓ Recuperarea mierii îmbogățite în polifenoli după 6 ore de extracție în contra-curent, recuperarea uleiului vegetal și reutilizarea lui pentru un nou ciclu de extracție, și trimiterea la compostare a materialului vegetal extras.

În cadrul procesului de mai sus detaliile specifice sunt următoarele.

Materialul vegetal utilizat în cadrul procedurii conform invenției este pulpă de cătină din care s-a extras uleiul, polen colectat de albine, pulpă de fructe de pădure, ca de ex. zmeura sau murele din care s-a extras suc, boască de struguri.

Amestecarea materialului vegetal cu apă se face în raport de 1 parte material vegetal la 19 părți apă, iar măcinarea umedă se realizează până la dimensiuni de 0,4-0,5 mm.

Amestecul de enzime care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular și feruol-esteraze este alcătuit din celulaze și xilanaze, min. 120 unități de celulază, 500 unități de xilanază, și, respectiv, 360 unități feruol-esterază per 100 grame de material vegetal supus extracției.

Recipientul de ultrafiltrare tangențială este prevăzut cu membrană de polietersulfonă, cu porii care au prag de masă moleculară de trecere (molecular weight cutoff) mai mic de 30 kDa.

Contactorul membranar pe care se face extracția include o membrană de politetrafluoretilenă (PTFE) cu pori de 0,2 μ , și este operată la o presiune de max. 1,5 bari.

Uleiul vegetal este ulei de floarea-soarelui, de soia sau de rapiță.

Compoziția de miere îmbogățită în polifenoli are un conținut de polifenol de cel puțin 600 mg echivalent acid galic per kg de miere și o activitate antioxidantă TEAC, de stingere a radicalului anionic ABTS, 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-sulfonat), de cel puțin 300 echivalent μ mol trolox per 100 grame de miere.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Favorizează difuzia și omogenizarea polifenolilor extrași în miere până în spațiul inter-molecular cu apă liberă disponibilă, datorită ultrasunării repetate;
- ✓ Nu influențează în mod semnificativ concentrația de apă liberă
- ✓ Eliberează cantități semnificative de polifenoli, inclusiv acizi fenolici, din materialul vegetal, ca urmare a activității specifice a amestecului de enzime;
- ✓ Permite separarea completă și rapidă a materialului vegetal extras și a enzimelor folosite pentru extracție, de mierea îmbogățită în polifenoli;
- ✓ Crește activitatea biologică a mierii, datorită îmbogățirii în polifenoli antioxidanți și durata de păstrare datorită lichefierii și eliminării microorganismelor spoliatoare care au capacitatea de a supraviețui și se înmulți la activități reduse ale apei în substrat.

În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita, în relație și cu figura 1.

Figura 1. Reprezentarea schematică a procedurii de îmbogățire în polifenoli din material vegetal a mierii

Exemplul 1. Pulpă de cătină din care s-a extras uleiul este măcinat pe o moară cu cuțite (Willey model 4, Thomas, Thermo Fischer, Waltham, MA, SUA), prevăzută cu o sită de 0,5 mm. 100 g de pulpă de cătină măcinată este adăugată într-un balon de 3500 ml cu fund plat, și cu trei găuri, echipat cu condensator de reflux, pâlnie de adăugare și termorezistență pentru monitorizarea temperaturii. pH-ul este corectat la 6,0 cu soluție 1 M HCl. Peste cele 100 grame pulpă se adaugă 1900 ml apă și un amestec de enzime care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular și feruloil-esteraze. Amestecul de enzime care acționează asupra peretelui celular este alcătuit din celulaze și xilanaze, min. 120 unități de celulază și

min. 500 unități de xilanază per 100 grame material vegetal supus extracției. Peste amestec se adaugă și 360 unități feruloil-esterază per 100 grame de material vegetal supus extracției.

O unitate celulazică este definită ca fiind cantitatea de enzime necesară pentru a elibera un μmol de echivalent grupări reducătoare de glucoză pe minut, din CM-celuloză 4M (10 mg/ml) în tampon fosfat de sodiu (100 mM), pH 6 la 40°C.

O unitate xilanazică FXU este definită ca fiind cantitatea de enzime necesară pentru a elibera o μmol de echivalent grupări reducătoare de xiloză pe minut, din arabinoxilan de grâu (5 mg/ml) în tampon MES tampon (100 mM), pH 6,5 la 45°C.

O unitate feruloil-esterazică (FAE) este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru eliberarea unui μmol de acid ferulic pe minut din etil-ferulat (0,39 mM) în tampon MOPS (100 mM), pH 6,0, la 45°C.

Celulaza care se folosește este 1,4-(1,3:1,4)- β -D-Glucan-4-glucano-hidrolaza din *Trichoderma reesei* ATCC 26921, pudră liofilizată, cu cel puțin 1 unitate per mg solid (Sigma-Aldrich, Merck Grup, Darmstad, Germania). Feruloil-esteraza este un preparat de la Biocatalysts (Cardiff, Marea-Britanie) produs din *Humicola insolens*, Depol 740L, standardizat în activitatea feruloil-esterazică (36 FAE per gram). Xilanaza este endo- β -(1 $\rightarrow$ 4)-xilanază termostabilă din *Thermomyces lanuginosus*, exprimată în *Aspergillus oryzae* modificat genetic, cu 2500 FXU per gram. Orice alte enzime cu aceleași caracteristici pot fi folosite.

Suspensia este amestecată energic cu un agitator magnetic, și încălzită până la 60°C. Se menține 1 oră. După o oră, se scoate pâlnia de adăugare și termorezistența și se înlocuiesc cu furtune de alimentare, și respectiv, de reîntoarcere retentat ale unui dispozitiv de ultrafiltrare. Furtunul de alimentare, prevăzut cu sită de 0,2 mm, este introdus până aproape de fundul balonului. Furtunul de reîntoarcere retentat se lasă deasupra suprafeței lichidului. Se continuă agitarea magnetică, iar furtunurile se conectează la 1 modul de ultrafiltrare Biomax, cu membrană de polietersulfonă, cu pragul de excludere de 30 kDa și cu o suprafață de 50 cm² (Merck Group, Darmstad, Germania), printr-un sistem de pompe pentru ultrafiltrare Cogent M1 (Merck Group). Furtunul de alimentare se conectează cu modulul de ultrafiltrare printr-o valvă distribuitor prevăzută cu debitmetru. Debitul de lucru al sistemului de ultrafiltrare se stabilește la 10 ml per min.

Ieșirea permeatului se cuplează printr-un furtun de silicon cu un vas de recepție a permeatului, care se lasă la suprafața lichidului. Vasul de recepție a permeatului de la ultrafiltrare este un balon de 2000 ml cu trei gâturi, echipat cu termorezistență pentru monitorizarea temperaturii. La fundul recipientului se introduce printr-unul din gâturile libere un furtun care se conectează printr-o valvă la o pompă peristaltică Masterflex L/S (Cole

Parmer, Vernon Hills, IL, SUA), cu un debit de operare de 20 ml/min. După 1 oră și 30 min de la începutul experimentului, respectiv 30 min de la începutul ultrafiltrării, se pornește pompa peristaltică, care alimentează un contactor membranar. Contactorul membranar este un modul de fixare a membranei dreptunghiular (10 * 50 mm), confecționat din două semi-celule din teflon, cu intrări și ieși de lichid, etanșate prin garnitură de cauciuc siliconic, care fixează o cu zona activă de 25 cm², membrană de politetrafluoretilenă (PTFE) cu pori de 0,2 μm. Membrana folosită este PTU022005, produsă de Sterlitech (Kent, WA, SUA), dar orice alt tip de membrană cu aceleași caracteristici poate fi folosită. Intrările și ieșirile celulelor contactorului membranar sunt prevăzute cu valve de reglare a debitului și manometre de indicare a presiunii. Presiunea de operare a contactorului membranar este de max. 1,5 bari, pentru a evita trecerea apei prin membrana hidrofobă de teflon. Furtunul de ieșire al contactorului membranar se întoarce în balonul cu 3 găuri, prin gâtul liber. Furtunul se lasă deasupra nivelului maxim al lichidului.

Pe cealaltă parte a membranei de teflon se trece ulei vegetal rafinat de floarea-soarelui, care provine dintr-un balon de 1000 ml, cu 5 găuri, termostatat pe agitator magnetic la 45°C, care conține 500 ml ulei de floarea-soarelui. Pe unul din găuri se introduce un furtun de cauciuc siliconic, care se duce până la fundul balonului. Din acest furtun se alimentează printr-o valvă o altă pompă peristaltică Masterflex L/S (Cole Parmer), care duce un debit de 10 ml pe min la contactorul membranar. Astfel se realizează extracția în contracurent lichid-lichid pe contactor membranar a permeatului, cu ulei vegetal, la temperatura de 45°C, cu reîntoarcerea în masa de permeat a permeatului extras. Această extracție se face timp de 5 ore, pentru a facilita extracția polifenolilor hidrofobi slab solubili în apă în ulei vegetal.

Uleiul vegetal în care s-au extras polifenolii se re-extrage în contra-curent lichid-lichid pe contactor membranar, față de miera care se dorește a fi îmbogățită în polifenoli, la 2 pre de la începutul extracției enzimatică în apă, și la 30 min de la începutul extracției în ulei a polifenolilor. 500 ml de miere se distribuie într-un balon cu 4 găuri. Pe un gât se introduce furtunul de lichide vâscoase a celei de a treia pompe Masterflex L/S (Cole Parmer), care alimentează cel de-al doilea contactor membranar. Pe un alt gât se introduce furtunul de ieșire al contactorului membranar, care se lasă deasupra lichidului. Un alt gât este pentru termostatarea mierii la 30°C, iar ultimul gât este pentru introducerea unei sonde de ultrasonare. Pentru a menține o bună fluiditate a mierii, ca și pentru a asigura omogenizarea polifenolilor extrași, se procedează la ultrasonizarea repetată, câte 3 min la fiecare oră, cu o putere de 400 W, a mierii în care se face extracția uleiului vegetal îmbogățit în polifenoli.

După 5 ore se oprește reacția de extracție enzimatică, iar materialul vegetal extras este trimis la compostare. Extracția polifenolilor în ulei mai continuă 90 min, iar extracția în contra-curent a polifenolilor din ulei în miere mai continuă alte 90 minute. În final se recuperează mierea îmbogățită în polifenoli și uleiului vegetal. Uleiul vegetal se poate reutiliza pentru un nou ciclu de extracție.

În mierea recuperată se determină conținutul de polifenoli, prin lichid cromatografie de înaltă presiune (Barberousse et al. 2009, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1634-1641) și activitatea antioxidantă TEAC (Alvarez-Suarez et al. 2009, *Current Analytical Chemistry*, 5, 293-302). Compoziția de miere îmbogățită în polifenoli rezultată are un conținut de polifenol de cel puțin 600 mg echivalent acid galic per kg de miere și o activitate antioxidantă TEAC, de stingere a radicalului anionic ABTS, 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-sulfonat), de cel puțin 300 echivalent μ moli trolox per 100 grame de miere.

Exemplul 2. Se lucrează ca în exemplu 1 cu următoarele diferențe. Materialul vegetal utilizat este polen colectat de albine, iar temperatura de extracție enzimatică este de 55°C.

Exemplul 3. Se lucrează ca în exemplu 1 cu următoarele diferențe. Materialul vegetal utilizat este zmeura din care s-a extras sucul, iar uleiul vegetal este ulei de soia.

Exemplul 4. Se lucrează ca în exemplu 1 cu următoarele diferențe. Materialul vegetal utilizat sunt căpșunile din care s-a extras sucul, iar uleiul vegetal este ulei de soia.

Exemplul 5. Se lucrează ca în exemplu 1 cu următoarele diferențe. Materialul vegetal utilizat este boasca de struguri, iar uleiul vegetal este ulei de rapiță.

Revendicări

1. Procedeu conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: măcinarea umedă a materialului vegetal și amestecarea cu apă; adăugarea unui amestec de enzime, alcătuit din hidrolaze care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular și feruoil-esteraze, urmată de extragerea asistată enzimatic a materialului vegetal în apă, timp de 5 ore la temperatura de 55-60°C și pH 6.0; ultrafiltrarea tangențială continuă a amestecului de material vegetal – apă – enzimă, începând din ora a 2-a, cu întoarcerea retentatului în masa de extracție asistată enzimatic; extracția în contracurent lichid-lichid pe contactor membranar a permeatului, cu ulei vegetal, la temperatura de 45°C, cu reîntoarcerea în masa de permeat a permeatului extras, la 90 min după începerea extracției enzimatice, timp de 5 ore; re-extracția uleiului vegetal în care s-au extras polifenoli în contracurent lichid-lichid pe contactor membranar, față de miera care se dorește a fi îmbogățită în polifenoli, care începe la 2 ore min după începerea reacției enzimatice; ultrasonizarea repetată, câte 3 min la fiecare 30 min, cu o putere de 400 W, a mierii în care se face extracția uleiului vegetal îmbogățit în polifenoli; recuperarea mierii îmbogățite în polifenoli după 6 ore de extracție în contra-curent, recuperarea uleiului vegetal și reutilizarea lui pentru un nou ciclu de extracție, și trimiterea la compostare a materialului vegetal extras.
2. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** materialul vegetal utilizat este pulpă de cătină din care s-a extras uleiul, polen colectat de albine, pulpă de fructe de pădure, ca de ex. zmeura sau murele din care s-a extras sucul, boască de struguri.
3. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** amestecarea materialului vegetal cu apă se face în raport de 1 parte material vegetal la 19 părți apă, iar măcinarea umedă se realizează până la dimensiuni de 0,4-0,5 mm.
4. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** amestecul de enzime care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular și feruoil-esteraze este alcătuit din celulaze și xilanaze, min. 120 unități de celulază, 500 unități de xilanază, și, respectiv, 360 unități feruloil-esterază per 100 grame de material vegetal supus extracției.
5. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** sistemul de ultrafiltrare tangențială este prevăzut cu membrană de polietersulfonă, cu porii care au prag de masă moleculară de trecere mai mic de 30 kDa.

6. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** include un contactor membranar pe care se face extracția cu o membrană de politetrafluoretilenă (PTFE) cu pori de 0,2 μ , care este operat la o presiune de max. 1,5 bari.
7. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** uleiul vegetal este ulei de floarea-soarelui, de soia sau de rapiță.
8. Compoziția de miere îmbogățită în polifenoli conform invenției, **caracterizată prin aceea că** are un conținut de polifenol de cel puțin 600 mg echivalent acid galic per kg de miere și o activitate antioxidantă TEAC, de stingere a radicalului anionic ABTS, 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-sulfonat), de cel puțin 300 echivalent μ moli trolox per 100 grame de miere.

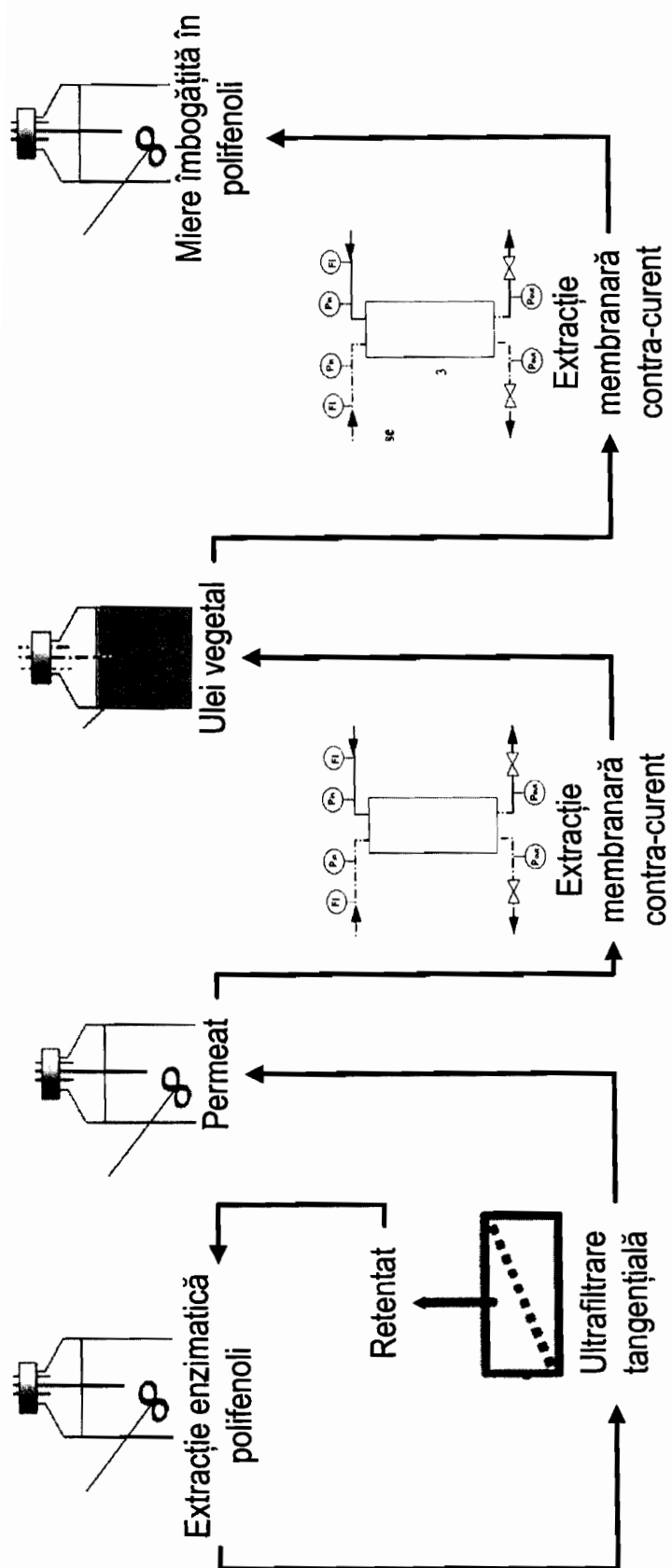


Figura 1