



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00932

(22) Data de depozit: 03.12.2012

(41) Data publicării cererii:  
29.11.2013 BOPI nr. 11/2013

(71) Solicitant:  
• SUNSHINE BUSINESS SERV S.R.L.,  
STR. CIMITIRULUI NR. 9, ANINOASA, DB,  
RO

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

• ROȘU LAURENȚIU, STR. CIMITIRULUI  
NR. 9, ANINOASA, DB, RO;  
• ȘTEFĂNESCU BOGDAN MIHAIL,  
STR. DRUMUL SĂRII NR. 63, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU PENTRU PRODUCEREA SIROPULUI DE  
FRUCTOZĂ, HRANĂ PENTRU ALBINE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de producere a siropului de fructoză din inulină din material vegetal, destinat pentru suplimentarea hranei pentru albine, în timpul iernii și în perioadele lipsite de cules. Procedeu conform invenției constă, într-o primă etapă, în tocarea materialului vegetal și amestecarea acestuia cu apă, în proporție de 1:1, apoi omogenizarea într-un omogenizator cu piston la înaltă presiune, două cicluri la 50 MPa, separarea prin filtrare a materialului lignocelulozic nesolubilizat de soluția care include componente hidroso-

lubile, din material vegetal, inclusiv inulina, urmată de hidroliza inulinei din soluție, prin adăugarea unei inulaze, și separarea prin ultrafiltrare tangențială a fructo-oligozaharidelor de proteine și ceilalți biopolimeri din soluție, și, în final, hidroliza fructo-oligozaharidelor din permeat pe o coloană care conține inulază imobilizată pe o rețea de nanofire polimerice.

Revendicări: 4



## PROCEDEU PENTRU PRODUCEREA SIROPULUI DE FRUCTOZĂ HRANĂ PENTRU ALBINE

Această invenție se referă la un procedeu de producere a siropului de fructoză, din inulină acumulată în organele de depozitare ale unor plante ca topinamburul, *Helianthus annuus*, dalia, *Dahlia* spp., cicoarea, *Cichorium intybus*, și care este destinat pentru suplimentarea hranei pentru albine, în timpul iernii și în perioadele lipsite de cules.

Sunt cunoscute diverse procedee de obținere a fructozei din inulină acumulată în organele de depozitare ale unor plante. Brevetul GB 659 501 se referă la un procedeu de obținere a fructozei din material vegetal care conține inulină, liber de inulază, obținut prin încălzirea materialului vegetal la 80°C, extracția cu apă în contracurent până la atingerea unei concentrații de 18% inulină, adăugarea de substanțe alcaline pentru creșterea pH până la 10...11, cristalizarea inulinei și hidroliza ei ulterioară prin procedee cunoscute. Pentru a reduce pierderile de carbohidrați în cursul procesului de obținere a fructozei din tuberculii de topinambur brevetul RU2218061 propune un procedeu care include electro-plasmoliza tuberculilor de topinambur tocați, separarea sucului cu inulină de pulpa epuizată prin presare, hidroliza inulinei cu acid orto-fosforic, purificarea sucului cu cărbune activ, clarificarea cu lapte de var și concentrarea siropului până la 50% fructoză.

Hidroliza acidă determină însă formarea unor compuși de deshidratare ai carbohidraților, ca de ex. 5-metil-furfuralul, care reduc puterea de îndulcire a siropului de fructoză și care sunt toxici pentru albine (Barker, 1977, Amer. Bee J. 117: 76-77).

Procedeele enzimatice de hidroliză a inulinei se desfășoară la temperaturi mai scăzute și la un pH ușor acid – neutru, deci este evitată formarea compușilor de deshidratare a carbohidraților. Brevetul SUA 4 277 563 descrie un procedeu de hidroliză enzimatică a inulinei, cu utilizarea inulazei în soluție apoasă, urmată de recuperarea fructozei cristaline din soluția apoasă. Se obține un produs de puritate avansată, dar consumurile de enzimă, utilizată liberă în soluție, ca și consumurile energetice necesare pentru cristalizarea fructozei, compus cu mare solubilitate în apă, sunt ridicate.

Cererea de brevet CN101845470 prezintă un procedeu de hidroliză a inulinei cu enzime imobilizate, prin care se obține un sirop cu un conținut ridicat de fructoză. Se reduce consumul de enzimă, care poate fi refolosită la mai multe cicluri de hidroliză, și se reduc consumurile energetice evitându-se cristalizarea fructozei. În majoritatea aplicațiilor industriale, inclusiv pentru hrănirea albinelor, fructoza se utilizează ca sirop. Deci o formă de comercializare a fructozei sub formă de sirop nu reprezintă un dezavantaj, ci dimpotrivă, este preferată datorită ușurinței în utilizare.

Procedeu prezentat de cererea de brevet CN101845470 determină și formarea de fructo-oligozaharide. Fructo-oligozaharidele au o acțiune prebiotică, stimulând dezvoltarea bacteriilor probiotice (Sangeetha *et al.*, 2005, Trends Food Sci. Tech., 16:442-457) benefice pentru sănătatea omului, deci prezența unor astfel de compuși în siropul de fructoză destinat consumului uman nu reprezintă un dezavantaj, ci un avantaj competitiv pentru produs, care poate fi comunicat consumatorilor și ca un produs prebiotic.

În cazul siropurilor de fructoză destinate hranei albinelor este însă necesar ca fructo-oligozaharidele să se re-găsească în cantitate cât mai mică. Concentrația în care fructo-oligozaharidele se regăsesc în miere, și care susține dezvoltarea unor bacterii probiotice benefice este de max. 58 mg/kg (0,058 mg/g, Mei *et al.*, 2010, Int. Food Res. J., 17:557-561). O cantitate mai ridicată de fructo-oligozaharide, în special din cele cu 3 și mai mult resturi de fructoză, reprezintă un indicator de falsificare a mierii cu sirop de fructoză obținut din inulină (Ruiz-Matute *et al.*, 2010, J. Food Compos. Anal. 23: 273-276). Siropurile de fructoză folosite pentru hrana albinelor trebuie să conțină concentrații foarte scăzute de oligo-fructozaharide, pentru a evita posibile probleme legate de suspiciuni privind falsificarea mierii, care pot apărea ca rezultat al transferului fructo-oligozaharidelor de către albine din hrana de substituție în mierea care ulterior este comercializată.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu de obținere, din material vegetal care conține inulină, a unui sirop de fructoză în care fructo-oligozaharidele se regăsesc în concentrații mai mici decât cele prezente în mod natural în miere.

Soluția la problema tehnică o reprezintă un procedeu de hidroliză a inulinei pe un sistem catalitic dublu, care include o hidroliză parțială a inulinei din suc obținut din material vegetal, pentru a permite formarea de fructo-oligozaharide,

care apoi sunt separate de proteine și alți biopolimeri prin ultrafiltrare tangențială, urmată de hidroliza fructo-oligozaharidelor separate prin trecere pe o coloană care conține inulază immobilizată pe o rețea de nanofire polimerice.

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- Tocarea tuberculilor de topinambur, a tuberculilor de dalie sau a rădăcinii de cicoare, și amestecarea materialului vegetal tocat cu apă, în proporție de 1:1;
- omogenizarea într-un omogenizator cu piston la înaltă presiune, două cicluri la 50 MPa;
- separarea prin filtrare a materialului lignocelulozic nesolubilizat de soluția care include componentele hidrosolubile din materialul vegetal, inclusiv inulina;
- hidroliza inulinei din soluție prin adăugarea unei inulaze și separarea prin ultrafiltrare tangențială a fructo-oligozaharidelor de proteine și ceilalți biopolimeri din soluție;
- hidroliza fructo-oligozaharidelor din permeat pe o coloană care conține inulază immobilizată pe o rețea de nanofire polimerice.

Aspecte preferate în realizarea procedurii sunt:

- hidroliza inulinei se realizează cu un amestec de exoinulază (EC 3.2.1.80) și endoinulinază (EC 3.2.1.7) din *Apergillus niger*, 1 g de enzimă cu o activitate de 2000 INU/g, aplicată într-o doză de 1 g la 1 litru soluție de compuși solubili din material inulinic, cu 7,5% s.u. determinată refractometric, timp de 4 ore la pH 4,6 și la temperatura de 50°C;
- ultrafiltrarea, pentru separarea fructo-oligozaharidelor de proteine și ceilalți biopolimeri din soluție, pe o membrană cu limită de excludere de 1 KDa, continuată până la atingerea unei concentrații de 8% fructo-oligozaharide în permeat;
- hidroliza oligozaharidelor din permeat pe o coloană care conține un amestec de exoinulază (EC 3.2.1.80) și endoinulinază (EC 3.2.1.7) din *Apergillus niger*, immobilizate pe o rețea de nanofire polimerice, la o activitate de 500 INU per ml de suport cromatografic, la temperatura de 45°C și la pH 5,5 și un debit de 5 ml/min pe o coloană de 250 ml.

Rețeaua de nanofire din polimerice în care este immobilizată inulaza este, de ex. o rețea de nanofire / nanotuburi de polipirol, distanțată de spumă poliuretanică acoperită cu tuburi de nanocarbon. Rețeaua de nano-fibre este fabricată prin folosirea abordării sintezei bazate pe membrane ca nano-matriță pentru formarea

nanomaterialelor, iar spuma de poliuretan acoperită cu tuburi de nanocarbon se prepară prin metoda strat-peste-strat ("layer-by-layer") formându-se un material cu un raport specific suprafață / volum foarte mare. Rețeaua de nanofire este omogenizată cu spuma poliuretanică acoperită cu tuburi de nanocarbon, în raport egal, 1 parte la 1 parte, în 4 părți tampon citrat pH 5,5, prin sonicare cu 100W timp de 15 min. O astfel de structură cu o foarte mare suprafață permite realizarea unei încărcări ridicate cu inulază a suportului și asigură o hidroliză totală a fructo-oligozaharidelor la fructoză.

Prezența invenției prezintă următoarele avantaje:

- Asigură formarea unui sirop de fructoză cu o mare valoare nutritivă pentru albine, fără compuși de deshidratate ai carbohidraților toxici pentru albine și cu un conținut de fructo-oligozaharide în limita celui prezent în mod natural în miere;
- Reduce pierderile de inulină în pulpa epuizată, inulina endocelulară fiind regăsită total în suc rezultat după omogenizarea la înaltă presiune, care lizează în totalitate celulele vegetale;
- Permite separarea proteinelor din materialul vegetal, care apoi pot fi prelucrate ca furaj pentru albine sau alte animale.

Invenția se ilustrează prin exemplul de mai jos.

*Exemplu.* 1000 g de tuberculi de topinambur se toacă pe o mașină de tocat. 1 parte material vegetal tocat se amestecă cu 1 parte apă și apoi se omogenizează într-un omogenizator cu piston (GEA Niro Soavi Arriete NS2006), două cicluri la 50 MPa. Materialul lignocelulozic nesolubilizat se separă prin filtrare de soluția care include componentele hidrosolubile din materialul vegetal, inclusiv inulina. Filtrarea se realizează pe hârtie de filtru Whatman nr.1, folosind o pâlnie Buchner pusă pe un vas Kitasato conectat la o trompă de apă.

Soluția rezultată se concentrează până la 7,5% substanță uscată determinată refractometric, iar în concentrat se aduce pH-ul la valoarea 4,6 prin adăugare de HCl 1 N. Concentratul se trece într-un balon cu fund plat de 1000 ml, cu trei gături, cu refrigerent, termometru, pâlnie de adăugare și agitator magnetic. Concentratul se aduce la temperatura de 50°C și se realizează hidroliza inulinei timp de 4 ore cu un amestec de exoinulază (EC 3.2.1.80) și endoinulinază (EC 3.2.1.7) din *Apergillus niger* (Fructozyme L, Novozyme A/S, Bagvaerd, Danemarca). 1 g de enzimă cu o activitate de 2000 INU/g este aplicată într-o

doză de 1 g la 1 litru soluție de compuși solubili din material inulinic, cu 7,5% s.u. determinată refractometric.

O unitate inulază, INU, este cantitatea de enzimă care produce 1  $\mu$ mol de zaharuri reducătoare (exprimate ca glucoză) pe min în condiții standard, la pH 4,5 și temperatura de 45°C. Orice alt amestec de exo- și endo-inulaze poate fi folosit, cu condiția asigurării activității enzimatice necesare.

- Hidrolizatul se reia și este ultrafiltrat tangențial pe un sistem de ultrafiltrare tangențială Prostat (Merck Millipore, Billerica, MA, SUA) prevăzut cu o membrană Ultracel PLAC (Merck Millipore) din celuloză regenerată, cu limită de excludere de 1 KDa. Se continuă ultrafiltrarea până la atingerea unei concentrații de 8% fructo-oligozaharide în permeat. Permeatul se trece pe o coloană cu diametrul de 4 cm și volum de 250 ml, care conține un amestec de exoinulază (EC 3.2.1.80) și endoinulinază (EC 3.2.1.7) din *Apergillus niger*, immobilizate pe o rețea de nanofire polimerice, la o activitate de 500 INU per ml de suport cromatografic, la un debit de 5 ml/min. Coloana este menținută la o temperatură de 45°C și a fost inițial echilibrată cu tampon citrat pH 5,5.

Enzima care se imobilizează este Fructozyme L (Novozyme A/S), cu o activitate inițială de 2000 INU/g. Rețeaua de nano-fire se fabrică, de preferință, pe o membrană de policarbonat cu pori mai mici de 0,2  $\mu$ , în care se formează nanofire de polipirol. Membrana de policarbonat este fixată între două tuburi, unul umplut cu soluție apoasă de 0,2 M monomer pirol și celălalt cu o soluție de oxidanți, 0,1 M FeCl<sub>3</sub> și 0,1 M (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>. Pori membranei, de circa 100 nm diametru, funcționează ca matrițe pentru polimerul care se formează în interiorul membranei. Pe măsură ce se formează polipirol în interiorul membranei soluția devine treptat verde-albastru întunecat. Procesul de nano-formare în matrița membranară este finalizat în circa 2..3 ore la temperatura camerei, polimerizarea continuând în afara porilor, la suprafețele membranei. În momentul în care se observă formare de polipirol pe ambele suprafețe ale membranei de policarbonat procesul de polimerizare se întrerupe prin îndepărtarea celor două soluții, o parte a membranei este curățată cu cloroform, iar pe cealaltă parte se depune un film de 50 nm de titan-aur, într-o incintă de depunere cu vacuum. Pentru a obține o rețea de nanofire membrana de policarbonat, care a folosit ca matriță este îndepărtată prin dizolvare în cloroform. Spuma poliuretanică cu nanotuburi de carbon folosită pentru distanțarea rețelelor de nanofire de polipirol se obțin în următoarele etape:

supra poliuretanică este tratată cu UV-ozon pentru 30 min. 0,1 g de nano-tuburi de carbon multistrat (MWNT), cu un diametru de 6..9 nm și lungimea de 5 μm sunt dispersate în 0,1 g de soluție 10mM polistiren sulfonat (SPS) și 0,1 N NaCl prin sonicare la 200 W timp de 40 min și apoi sunt incubate pentru 24 ore. Rezultă SPS acoperit cu MWNT, care este separat prin filtrare pe o membrană cu pori de 0,22 μm, și spălat pe filtru de trei ori cu apă distilată. SPS acoperit cu MWNT este redispersat în apă distilată prin sonicare la 100 W timp de 15 min. Spuma poliuretanică este imersată în 1% soluție polietilenimină (PEI) timp de o oră și spălată de trei ori cu apă distilată. Este apoi imersată în soluție de SPS acoperit cu MWNT pentru 15 min, urmată de spălări cu apă distilată de trei ori. Spuma poliuretanică este apoi acoperită cu un monostrat de policlorură de dialildimetilamoniu (PDAC) prin scufundare în soluție 20mMPDAC cu 0,1 M NaCl pentru 20 min, urmată de spălare cu apă distilată de trei ori. Procesul este repetat până la formarea a 5 straturi de SPS-MWNT/PDAC pe spuma poliuretanică. Spuma poliuretanică acoperită cu cinci straturi SPS-MWNT/PDAC este apoi omogenizată cu rețea de tuburi de nanopirool, în raport egal, 1 parte la 1 parte, în 4 părți tampon citrat pH 5,5, prin sonicare cu 100W timp de 15 min. Suspensia rezultată este împachetată de o coloană de diametrul de 4 cm și volum de 250 ml. Pe această coloană se realizează fixarea enzimei prin percolarea a 180 ml soluție obținută prin diluarea 1:1, cu tampon citrat pH 5,5, a Fructozyme L, 2000 INU/ml, la un debit de 0,5 ml/min. Coloana se menține la temperatura de 40°C prin termostatarea eluantului, și se aplică o diferență de potențial de 1,5 V între partea superioară și cea inferioară, anodul fiind în partea superioară. Această diferență de tensiune face ca polipiroolul să se încarce electric și să interacționeze cu resturile de aminoacizi încărcăți negativ din structura inulinei. Se obține o coloană care are o activitate inulazică de 500 INU/ml, corespunzând unui randament de imobilizare de 56,94%. Amestecul de inulaze imobilizate își menține activitatea la 500 INU timp de 96 ore, după care coloana se regenerează prin percolare cu o soluție uree 1 M în tampon citrat pH 4,5.

Siropul rezultat se concentrează până la 63% substanță uscată prin evaporare la vid. Conținutul de carbohidrați, determinat conform ISO 10504:1998, este de 597,2 g/fructoză și 33,8 g/glucoză. În sirop se determină fructo-oligozaharidele, prin metoda descrisă de Ruiz-Matute *et al.*, 2010, J. Food Compos. Anal. 23: 273-276, pe un sistem Agilent 6224 Accurate Mass TOF

LC/MS-MS (Agilent, Santa Clara, CA, SUA). Nivelul este mai mic de 0,058 mg/g, descris ca fiind natural prezent în mierea naturală (Mei *et al.*, 2010, Int. Food Res. J., 17:557-561).

Produsul a fost experimentat în primăvara anului 2012, într-o perioadă cu lipsă temporară de nectar, între sfârșitul culesului la salcâm și înainte de începerea culesului la floarea-soarelui, la sfârșitul lunii mai. Experimentul s-a realizat în cadrul unei singure stupine, aparținând unuia dintre autori, și a inclus următoarele variante experimentale: V<sub>1</sub> – martor netratat; V<sub>2</sub> – hrănire cu 2,2 kg de sirop invertit de zahăr (Apiinvert<sup>®</sup>, Agrana, Viena, Austria); V<sub>3</sub> – hrănire cu 2,2 kg de sirop de fructoză realizat conform invenției. Hrana s-a aplicat pe hrănitorul de pe podișor. Fiecare variantă experimentală a inclus patru repetiții, fiecare repetiție incluzând câte 3 stupi, fiecare stup având 15.000 albine; randomizarea celor patru variante în patru repetiții a fost făcută în pătrat latin. După cele 4 săptămâni de hrănire de substituție stupi au fost mutați la marginea unui lan de floarea-soarelui (cv. Pro 229, Procera seeds, Fundulea, România) unde au fost menținuți timp de trei săptămâni monitorizându-se săptămânal prin cântărire acumularea de miere și de biomasă de albine. Datele obținute în cadrul experimentului s-au prelucrat prin analiza varianței (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1 prezentat mai jos. Aceste rezultate demonstrează o eficacitate bună a produsului rezultat prin aplicarea procedurii conform invenției, inclusiv în reducerea ascosferozei datorită efectului pre-biotic al fructo-oligozaharidelor prezente rezidual în sirop.

Tab. 1. Efectul produsului realizat conform procedurii prezent de invenție, aplicat ca hrană pentru albine în perioadele lipsite de cules\*

Tratament	Puiet văros (nr. mediu larve pe săptămână)	Producție miere, medie lunară**
V <sub>1</sub> martor netratat	752c	12,52c
V <sub>2</sub> 2,2 kg de sirop invertit de zahăr (Apiinvert <sup>®</sup> , Agrana	380a	17,34b
V <sub>3</sub> 2,2 kg de sirop de fructoză realizat conform invenției	115a	20,27a

\*valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P>0,05

\*\*media lunară per variantă a lunii de cules la floarea-soarelui, care a urmat la 28 zile de la aplicarea tratamentului



## REVEDICARI

1. Procedeu de producere a siropului de fructoză, din inulină acumulată în organele de depozitare ale unor plante ca topinamburul, *Helianthus annuus*, dalia, *Dahlia* spp., cicoarea, *Cichorium intybus*, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: tocarea tuberculilor de topinambur, a tuberculilor de dalie sau a rădăcinii de cicoare, și amestecarea materialului vegetal tocat cu apă, în proporție de 1:1; omogenizarea într-un omogenizator cu piston la înaltă presiune, două cicluri la 50 MPa; separarea prin filtrare a materialului lignocelulozic nesolubilizat de soluția care include componentele hidrosolubile din materialul vegetal, inclusiv inulina; hidroliza inulinei din soluție prin adăugarea unei inulaze și separarea prin ultrafiltrare tangențială a fructo-oligozaharidelor de proteine și ceilalți biopolimeri din soluție; hidroliza fructo-oligozaharidelor din permeat pe o coloană care conține inulază immobilizată pe o rețea de nanofire polimerice.
2. Etapă de hidroliză a inulinei conform procedului din revendicarea 1, **caracterizată prin aceea că** se realizează cu un amestec de exoinulază (EC 3.2.1.80) și endoinulinază (EC 3.2.1.7) din *Apergillus niger*, 1 g de enzimă cu o activitate de 2000 INU/g , aplicată într-o doză de 1 g la 1 litru soluție de compuși solubili din material inulinic, cu 7,5% s.u. determinată refractometric, timp de 4 ore la pH 4,6 și la temperatura de 50°C;
3. Etapă de ultrafiltrare pentru separarea fructo-oligozaharidelor de proteine și ceilalți biopolimeri din soluție conform procedului din revendicarea 1, **caracterizată prin aceea că** se realizează pe o membrană cu limită de excludere de 1 KDa, continuată până la atingerea unei concentrații de 8% fructo-oligozaharide în permeat;
4. Etapă de hidroliza oligozaharidelor din permeat conform procedului din revendicarea 1, **caracterizată prin aceea că** se realizează pe o coloană care conține un amestec de exoinulază (EC 3.2.1.80) și endoinulinază (EC 3.2.1.7) din *Apergillus niger*, immobilizate pe o rețea de nanofire polimerice, la o activitate de 500 INU per ml de suport cromatografic, la temperatura de 45°C și la pH 5,5 și un debit de 5 ml/min pe o coloană de 250 ml.