



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00723

(22) Data de depozit: 12.10.2012

(41) Data publicării cererii:
30.12.2013 BOPI nr. 12/2013

(71) Solicitant:
• MEDISAN 2010 S.R.L., STR.CARPAȚI
NR.8, MEDIAȘ, SB, RO

(72) Inventatori:
• VELEA SANDA, STR.ZAMBILELOR NR.6,
BL.60, ET.2, AP.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO;

• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BLAJAN OLIMPIU, ȘOS.SIBIULUI NR.46,
BL.8, ET.1, AP.2, MEDIAȘ, SB, RO

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA DE CHELAȚI AI
AMINOACIZILOR CU MICROELEMENTE ESENȚIALE**

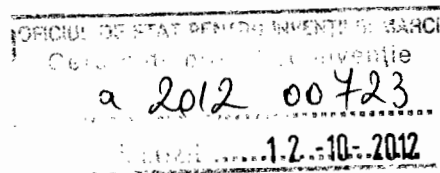
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor complecși chelatați, utilizați ca aditivi în compoziții furajere. Procedeu conform invenției constă din spălarea materialului proteic constând din drojdie de bere, șrot de rapiță, sau concentrat proteic de zer, cu o soluție de carbonat de sodiu, urmată de ultrasonarea amestecului timp de 2 min, la 400 W, hidroliza cu un amestec de proteaze microbiene, endoproteaze și amidoproteaze la o temperatură de 55...60°C, timp de

16...20 h, după care hidrolizatului este ultrafiltrat, pentru îndepărtarea particulelor cu o masă moleculară mai mare de 3 kDa, urmat de concentrarea hidrolizatului până la 15% substanță uscată, la care se adaugă un compus insolubil de Mo, Se, Cr/greu solubili de Mn, Zn, Fe, B, amestecul se supune ultrasonării, rezultând un complex chelatat care este uscat prin pulverizare.

Revendicări: 4





PROCEDEU DE PREPARARE DE CHELAȚI AI AMINOACIZILOR CU MICRO-ELEMENTE ESENȚIALE

Această invenție se referă la un procedeu de obținere a unor chelați ai aminoacizilor cu micro-elemente esențiale, care sunt destinați utilizării ca aditivi furajeri sau alimentari, suplimente nutritive sau fertilizanți cu micro-nutrienți pentru plante.

Sunt cunoscute o serie de procedee care au ca scop obținerea de complecși chelatați ai diferitelor micro-elemente esențiale cu alfa-aminoacizii. Acești complecși sunt obținuți prin chelatarea ionilor de micro-elemente esențiale folosind ca liganzi aminoacizi puri sau hidrolizate proteice care conțin amestecuri de aminoacizi și peptide. Aceste produse sunt cunoscute sub denumirea comercială generică de "chelați ai aminoacizilor cu metalele", în cazul folosirii aminoacizilor puri ca liganzi, și de "proteinați ai metalelor" sau de chelați peptidici ai metalelor" când se folosesc hidrolizatele proteice ca liganzi, deși unele dintre micro-elementele esențiale implicate în aceste complexe, ca seleniul și borul, sunt metaloizi și nu metale. Asociația Americană a Oficialilor (pentru) Controlul Furajelor a definit "proteinații metalici" ca fiind produsul rezultat dintr-o reacție a unei sari solubile cu aminoacizii și/sau cu proteinele parțial hidrolizate, Acești proteinați solubili trebuie să includă de asemenea și cel puțin un ciclu chelatant, ceea ce presupune existența unor liganzi polidentăți în care grupele donoare sunt astfel aranjate în moleculă încât se pot lega concomitent de același ion de metal/micro-element esențial. În documentele oficiale ale UE (ca de exemplu Regulamentul (CE) nr. 1334/2003 al Comisiei din 25 iulie 2003 de modificare a condițiilor de autorizare a unui număr de aditivi în furaje, care fac parte din grupa de micro-elemente) produsul obținut prin complexarea unui micro-element cu hidrolizatele proteice este menționat ca fiind „chelate al unui aminoacid”. Regulamentul european a atribuit și o formulă acestui complex al micro-elementelor cu aminoacizii, $Me(X)_{1-3} \cdot nH_2O$, în care X este anionul oricărui aminoacid format prin hidroliza proteinelor. Masa moleculară maximă a unui astfel de „chelate de aminoacizi” este 1800 Da, fiind la limita de absorbție prin bariera intestinală

(Daniel, H., 2004, *Ann Rev. Physiol.*, 66:361-384). Deci, în conformitate cu reglementarea EU în vigoare, proteinații, care pot fi formați cu tetrapeptide/polipeptide, nu sunt permisi ca aditivi furajeri, fiind considerați probabil ca având o masă moleculară prea mare pentru asimilare directă prin bariera intestinală.

Folosirea hidrolizatorilor proteice asigură un avantaj economic față de folosirea aminoacizilor puri ca liganzi. US 6323354B1 dezvăluie un procedeu de preparare a chelaților de aminoacizi cu ionii metalici din lipoproteine și săruri metalice. Aminoacizii sunt obținuți prin hidroliza lipoproteinelor obținute din, de exemplu, pereți celulari microbieni fracturați (formați în timpul procesului de biosinteză a aminoacizilor). Lipoproteinele sunt hidrolizate cu baze puternice, cum este hidroxidul de sodiu, iar hidrolizatul rezultat este reacționat cu compușii metalici, cum este sulfatul de zinc, pentru a obține un chelat de aminoacid. US 6,541,051 prezintă un procedeu de producere a complexilor de aminoacizi, în care aminoacizii sunt obținuți prin hidroliza proteinei din soia. Proteina este hidrolizată cu un acid mineral puternic (exemplificat cu acid hidroclic), iar hidrolizatul rezultat este reacționat cu un compus metalic (exemplificat prin oxidul de zinc), pentru a obține chelați ai aminoacizilor.

Hidroliza cu acizi sau baze minerale puternice are câteva dezavantaje, Manipularea acizilor minerali sau a bazelor necesită echipamente speciale și măsuri speciale de siguranță. În plus, sărurile disociate rezultate din neutralizarea acizilor minerali puternici (de ex. sulfat sau cloruri) sau a bazelor puternice (de ex. sodiu și potasiu) rămân în hidrolizatele proteice și diluează chelații aminoacizilor care se doresc a fi obținuți. Pentru hidroliza legăturilor peptidice care implică aminoacizi cu lanț lateral hidrofob, ca valina, leucina și izoleucina, sunt necesare perioade mai lungi și temperaturi ridicate. Hidroliza acidă distruge triptofanul și determină pierderi de serină și treonină (Aitken, A., Learmonth, M., 2002, *The Protein Protocols Handbook, Part I*, Springer Verlag, Berlin, pag. 41-44.). Hidroliza alcalină distruge cantități semnificative de arginină, glutamină și serină. Reticularea peptidelor formate consecutivă reacției de beta-eliminare la nivelul resturilor de serină, cisteină și treonină se desfășoară cu racemizarea din conformația originală L într-un amestec de aminoacizi DL (Kaye, G.I., Weber, P.B., Evans, A., Venezia, R.A., 1998, *Contemp. Topics*, 37: 43-46). Formarea unor astfel de produse limitează biodisponibilitatea elementelor esențiale incluse în

astfel de chelați. Biodisponibilitatea relativă pentru pui de găină, a manganului inclus în chelații de mangan rezultați din procesul descris în brevetul US 6,323,354B1, a fost cu circa 15% mai mică decât cea a sulfatului de mangan de calitate reactiv, după introducerea datelor într-un model de regresie (Miles, R.D., Henry, P.R., Sampath, V.C., Shivazad, M. and Comer, C.W. 2003.. J. Appl. Poult. Res., 12: 417-423.).

Hidroliza enzimatică pare să fie mai potrivită pentru producerea unor chelați ai aminoacizilor (proveniți din hidroliza proteinelor). Hidroliza proteinelor de către enzime este o duplicare a celei care apare natural în tractul gastro-intestinal. Temperatura ridicată necesară pentru condițiile extreme acide sau bazice, menținută pentru o perioadă lungă de timp, de până la 24 ore, nu este folosită și în procedeele enzimatiche de hidroliză a proteinelor. Acest fapt determină evitarea distrugerii aminoacizilor și formarea de produși secundari nedorți. Pentru că hidroliza enzimatică are loc în condiții de pH neutru sau aproape de neutru, nu este necesară o etapă de neutralizare, evitându-se formarea sărurilor care diluează chelați de aminoacizi.

În stadiul anterior al tehnicii în domeniu sunt propuse câteva procedee enzimatiche de preparare a chelaților de micro-elemente. Brevetul US 3,969,540 descrie un procedeu al cărui scop este cel de obținere a unui proteinat metalic din hidrolizate proteice și săruri metalice. Hidrolizatele proteice sunt obținute din diferite materiale proteice (cazeină, pulbere de ficat, țesuturi glandulare, autolizat de drojdie, proteină de soia, gelatină), hidrolizate cu proteaze de origine animală sau vegetală. Brevetul US 4,172,072 prezintă un procedeu de producere enzimatică a unui proteinat metalic tamponat, în care colagenul este hidrolizat prin folosirea unei proteaze de origine vegetală.

Proteinele de origine vegetală sau animală au o structură terțiară sau cuaternară, care este rezistentă la hidroliza enzimatică. Această rezistență la hidroliza enzimatică este chiar mai mare atunci când proteinele sunt incluse în structuri complexe ca țesuturile animalelor, șroturi de semințe oleaginoase delipidizate sau biomasă de drojdie recuperată din procesele industriale. Este necesar un procedeu îmbunătățit pentru dizolvarea proteinelor din materiile prime proteice și pentru exprimarea legăturilor peptidice susceptibile de a fi clivate de proteaze.

Unele dintre materiile prime cu un conținut ridicat de proteine (ca de ex. drojdia recuperată de la fabricarea berii sau șrotul de rapiță) au un gust amar specific, care poate trece în chelații de aminoacizi rezultați reducându-le palatabilitatea.

În cazul materiilor prime proteice complexe (ca pulberea de ficat, țesuturi glandulare, drojdie autolizată, biomasă bacteriană) sunt prezenți și alți compuși (ca de ex, acizi nucleici sau oligozaharide) care interferă cu formarea chelaților de aminoacizi. Proteinele hidrolizate enzimatic conțin o proporție largă de oligopeptide, care interferă cu formarea chelaților de aminoacizi. Di-peptidele sau chiar și tri-peptidele sunt acceptate ca molecule – purtător pentru microelementele esențiale, păstrând avantajul unei biodisponibilități crescute. Chelații alfa – aminoacizilor sau al di/tri – peptidelor sunt absorbiți ușor în celulele absorbante din mucoasele intestinului animalelor sau în celulele plantelor prin intermediul transportului activ sau a altor mecanisme cunoscute. Micro-elementele sunt absorbite împreună cu aminoacizii și/sau di/tri-peptidele ca o singură unitate, aminoacizii/peptidele fiind molecule purtător. Astfel sunt evitate problemele asociate cu competiția ionilor pentru situsurile active și supresia unor microelemente de către altele. Acest fapt este valabil în special pentru compuși ca sulfatul de fier, care trebuie administrat în cantități mari pentru a permite asimilarea cantităților fiziologic necesare de către organismele vegetale sau animale. Cantitățile mari administrate adesea determină fenomene negative, ca greață sau alte manifestări de disconfort intestinal la animale, sau fenomene de fitotoxicitate la plante.

Chelații cu oligopeptide mai mari de 3 resturi de aminoacizi au o biodisponibilitate mai redusă; din acest motiv Regulamentul UE în vigoare exclude astfel de compuși de la comercializare. Este nevoie de un procedeu care să asigure formarea cu precădere a chelaților având maximum 3 resturi de aminoacizi. Brevetul US 8,071,331 descrie un procedeu de producere a chelaților de aminoacizi în care se revendică ca numai implicarea aminoacizilor liberi și a di/tri-peptidelor. Biomasa bacteriană (suspensia celulară obținută ca produs secundar la fabricarea lizinei) este hidrolizată cu un amestec complex de hidrolaze care are și activitatea proteazică (pancreatină), în condiții optime, pentru a produce mai ales aminoacizi liberi și di/tri-peptide.

Hidrolizatul rezultat este folosit pentru complexarea unei sări solubile a unui metal, cum este de exemplu sulfatul de zinc. Procedeu descris de brevetul US 8,071,331 nu furnizează informații referitoare la evitarea interferențelor cu alți compuși prezenți în biomasa bacteriană folosită ca materie primă (care sunt de asemenea eliberați din substratul inițial datorită amilazei și lipazei prezente în preparatul de pancreatină folosit în cadrul acestui procedeu. Biomasa bacteriană conține 20% substanță uscată, dintre care 16% proteină brută; restul de 4% substanță uscată este constituit probabil din acizi nucleici, lipide sau oligozaharide asociate pereretului celular, care pot competiționa pentru complexarea ionilor micro-elementelor esențiale.

Folosire sărurilor solubile în apă pentru a face chelați de aminoacizi generează și problema contra-ionilor adiționali, solubili în apă (sulfat, clorură, sodiu, potasiu). Brevetul US 2,877,253 dezvăluie un produs format prin reacția unui mol de glicină cu un mol de sulfat feros. Brevetul indică faptul că anionii sulfat devin legați de reacție, care se pare că duce la formarea unui complex sulfat feros – glicină. Indiferent dacă sulfatul de fapt participă în reacție sau pur și simplu este prezent ca sarea unui metal alcalin, el este totuși prezent permanent în amestecul de reacție. Deci, în cele mai multe cazuri, sulfatul interferă cu reacția totală și cu absorbția chelatului format. Astfel de produse complexe, cu contraionul asociat chelatului de aminoacid sunt dificil de purificat. Pentru că sulfatul de sodiu, în sine, este solubil în apă, reacția dintre un sulfat metalic și un aminoacid nu este niciodată totală, ionul de sulfat fiind întotdeauna prezent. Aceeași situație este și în cazul ionilor de clorură, atunci când se folosesc sărurile de clorură pentru prepararea chelaților de aminoacizi.

Când se folosesc hidrolizate proteice pentru producerea chelaților de aminoacizi di/tri-peptidele competiționează pentru chelatarea ionilor de micro-elemente, legând numai un atom per moleculă și generând un exces de ioni de micro-elemente nelegat. Incompleta utilizare a tuturor valențelor (secundare), corespunzătoare situsurilor de legare co-ordinativă ale ionilor metalici, și sarcinile asociate cu liganzii rezultate în urma chelatării incomplete a liganzilor la ionii metalici, generează un gust metalic, pe care unii oameni sau animale îl găsesc ca fiind neplăcut sau dezagreabil (după cum este arătat și în brevetul US 5,516,925. În brevetul menționat mai sus, US 5,516,925 (publicat și ca WO9606101 (A1) NZ292002 (A) JPH10504822 (A) EP0777672 (A1) CA2198258 (A1) BR9508746

(A) AU3368195 (A) AU689312 (B2)), folosirea aminoacizilor puri, în amestec cu acizii organici (dicarboxilici, hidroxicarboxilici, hidroxidicarboxilici sau hidroxitricarboxilici) determină menținerea moleculelor de chelați la un pH optim pentru stabilitate și palabilitate, dar această soluție nu este utilizabilă și pentru hidrolizatele proteice, în care este dificil de stabilit raportul exact între aminoacizii liberi și di / tri /oligopeptide necesar calculului stoichiometric asociat acestui tip de tamponare.

Utilizarea de compuși insolubili / greu solubili ai micro-elementelor esențiale, ca oxizii, carbonații sau săruri cu metalele alcalino-pământoase, permite soluționarea atât a problemelor asociate excesului de ioni de micro-elemente, cât și pe cea a contra-ionului adițional. Reacția de chelatare deplasează echilibrului de solubilitate a produsului, dar formarea chelatului de aminoacizi din compuși insolubili ai micro-elementelor necesită cantități semnificative de apă și o perioadă lungă de reacție, așa cum este arătat și în brevetul US 4,830,716. Timpul lung de reacție, ca și necesitatea de a usca prin pulverizare sau pe tambur un produs conținând cantități ridicate de apă este la limita fezabilității economice.

Ca urmare, este necesară dezvoltarea unui procedeu care să asigure o viteză mai ridicată de formare a chelaților de aminoacizi cu ionii de micro-elemente esențiale din compuși cu solubilitate redusă, cum sunt oxizii, carbonații sau sărurile cu metale alcalino-pământoase.

Această invenție intenționează să furnizeze un procedeu de producere a chelaților ai aminoacizilor cu micro-elemente, în care au fost expuse legăturile peptidice care urmează a fi hidrolizate și în care aminoacizii liberi și/sau liganzii di/tri peptidici sunt obținuți din materii prime proteice larg accesibile, a căror palatabilitate a fost îmbunătățită prin reducerea nivelului de compuși amari și formarea unor compuși care îmbunătățesc gustul. Este un alt obiect al acestei invenții de a furniza un procedeu pentru obținerea de chelați ai aminoacizilor cu micro-elemente, în care respectivii chelați ai aminoacizilor conțin concentrații ridicate de micro elemente esențiale și concentrații reduse de ioni în exces și sunt produși cu costuri reduse, folosind compuși insolubili ca sursă de ioni de micro-elemente.

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

Spălarea materialului proteic cu o soluție de 5% Na_2CO_3 pentru înlăturarea unei părți semnificative a compușilor responsabili pentru gustul amar și pentru distrugerea inițială a structurii cuaternare și terțiare a proteinelor;

Dispersia materialului proteic în apă, urmat de adăugare de lipază microbiană și de continuarea reacției într-un mediu înalt dispersat, rezultat prin ultrasonarea amestecului, pentru formarea unor compuși de aromă care cresc palatabilitatea produsului și pentru o mai bună expunere a legăturilor peptidice care urmează să fie hidrolizate;

Hidroliza materialului proteic cu un amestec de proteaze microbiene, endo-proteaze și amidopeptidaze, la pH neutru și temperatură de 55 ... 60°C, procedeul de hidroliză enzimatică fiind continuat timp de 16...20 ore, până când se atinge un randament maxim în aminoacizi liberi și di/tri-peptide.

Centrifugarea eventualelor resturi de material nereacționat, urmată de ultrafiltrarea hidrolizatului rezultat printr-una sau mai multe membrane care filtrează particulele cu o masă moleculară mai mare de 3 kDa;

Concentrarea prin evaporare la presiune redusă a hidrolizatului enzimatic până la 15% substanță uscată;

Adăugarea unui compus insolubil al micro-elementului esențial;

Ultrasonicarea cu 400 W a amestecului hidrolizat enzimatic – compus insolubil al micro-elementului timp de 30 min la 45°C;

Centrifugarea excesului de compus insolubil al micro-elementului și uscarea supernatantului prin pulverizare la o temperatură de intrare de 140... 145°C și o temperatură de ieșire de 80 ... 85°C.

Ca atare într-un prim aspect invecția se referă la un procedeu de preparare a unor chelați ai aminoacizilor cu micro-elemente esențiale care cuprinde din următoarele etape:

- spălarea materialului proteic cu o soluție de 5% Na_2CO_3 , urmată de ultrasonarea amestecului cu 400 W timp de 20 min la 40°C, și tratament cu lipază microbiană la un raport 15.....25 LU/1g material proteic,

- hidroliza materialului proteic cu un amestec de proteaze microbiene, endo-proteaze și amidopeptidaze, la pH neutru și temperatură de 55 ... 60°C, timp de 16...20 ore, urmată centrifugare la 5000xg urmată de ultrafiltrarea hidrolizatului cu îndepărtarea particulelelor cu o masă moleculară mai mare de 3 kDa;

concentrarea prin evaporare la presiune redusă a hidrolizatului enzimatic până la 15% substanță uscată;

- adăugarea unui compus insolubil / greu solubil al micro-elementului esențial la un raport de 1 mol compuși insolubili / greu solubili de Mn, Zn, Fe, B la 2 moli de aminoacizi totali, teoretic rezultați prin hidroliza totală a materialului proteic, 15 mM compus insolubil de molibden la 1 mol de aminoacizi, 1,75 mM compus insolubil de seleniu la 1 moli de aminoacizi, 5 mM compus insolubil de crom la 2 moli de aminoacizi, ultrasonarea amestecului cu 400 W timp de 30 min la 45°C;

- centrifugarea excesului de compus insolubil al micro-elementului și uscarea supernatantului prin pulverizare la o temperatură de intrare de 140... 145°C și o temperatură de ieșire de 80 ... 85°C.

Într-un aspect preferat, în procedeul definit mai sus lipaza microbiană este selectată dintre enzima *Rhizomucor* exprimată în *Aspergillus oryzae*

Într-un alt aspect al invenției în procedeul definit mai sus materialul proteic este selectat dintre drojdie de bere, șrot de rapiță, șrot de soia, concentrat proteic de zer.

Într-un alt aspect al invenției în procedeul definit mai sus compusul insolubil al elementului esențial este selectat dintre carbonat de mangan(II), carbonat de crom(III), selenit de magneziu hexahidrat, hexaborat dicalcic hexahidrat, oxid de molibden, carbonat bazic de zinc, oxid feric.

Procedeul corespunzător invenției are următoarele avantaje:

- Elimină o mare parte din compușii responsabili pentru gustul amar și asigură formarea unor noi compuși de aromă, pentru o palatabilitate superioară a produselor finale destinate utilizării ca aditivi furajer sau alimentar;
- Determină un randament superior al hidrolizei enzimatice și a materialelor proteice mai rezistent la hidroliza enzimatică, ca șroturile provenite din semințe oleaginoase;
- Asigură formarea predominantă a chelaților de aminoacizi liberi și de di/tripeptide;
- Limitează concentrația ionilor în exces, reducând gustul metalic și îmbunătățind palatabilitatea;

- Adaugă o valoare superioară co-produselor din industria alimentară ca drojdia rezultată la fabricarea berii, șroturile de la fabricarea uleiurilor vegetale, zerului de la fabricarea brânzeturilor;
- Permite separarea celorlalți constituenți din materialul proteic (ca acizii nucleici sau glucanii din pereții celulari) care pot ulterior folosiți pentru fabricarea de produse cu valoare adăugată mare ca potențiatori de gust (ribonucleotidele din acizii nucleici de drojdie) sau agenți de emulsifiere (glucanii din peretele celular).
- Limitează reacțiile redox în care sunt implicate unele micro-elemente esențiale cu stări de oxidare multiple, reducând riscul formării speciilor cu toxicitate ridicată, ca de ex. Cr^{+6} .
- Poate fi adaptat la producerea diferitelor forme de chelați ai aminoacizilor cu diferitele micro-elemente, care pot fi folosiți ca fertilizatori foliari, aditivi alimentari sau pentru furaje, suplimente nutritive.

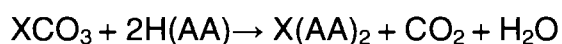
În continuare invenția va fi descrisă prin prezentarea unor exemple de realizare.

Exemplu 1. Drojdia de la fabricarea berii este recoltată prin centrifugare. Este spălată cu o soluție de 5% Na_2CO_3 , la un raport de 1 volum soluție de 5% Na_2CO_3 cu 2 volume de suspensie de drojdie, pentru înlăturarea compușilor amari. Drojdia din soluția de spălare este recuperată prin centrifugare, 5000xg pentru 10 min. În sedimentul rezultat substanța uscată este determinată după uscare la 105°C pentru 4 ore și cântărire la o balanță electronică. Un volum de sediment corespunzând la 25 g de drojdie substanță uscată este adăugat într-un balon de 1000 ml cu fund plat, echipat cu condensatori de reflux, pâlnie de adăugare și termorezistență pentru monitorizarea temperaturii. Volumul se completează la cu apă până la 250 ml, iar pH-ul este corectat la 7 cu soluție 20% H_3PO_4 . Se adaugă lipază microbială, Palatase® (Novozyme, enzimă din *Rhizomucor miehei* exprimată în *Aspergillus oryzae*), cu o activitate de 20.000 LU/g, în cantitate de 20 unități LU/g de material proteic, respectiv 50 mg. O unitate lipazică LU este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care, în condiții standard, (la 30,0°C, pH 7,0, cu gumă arabică ca emulsifiant și tributirina ca substrat, eliberează 1 mmol de acid butiric titrabil/min.

Lichidul este amestecat energic cu un agitator magnetic, și încălzit până la 35°C. Se scoate pâlnia de adăugare și se introduce o sondă ultrasonică. Suspensia de drojdie cu enzimă este sonicată timp de 20 min cu 400 W timp la

40°C. După finalizarea ciclului de sonicare, se scoate sonda, se reintroduce pâlnia, iar suspensia de drojdie este încălzită la 60°C. Se adaugă 0,025 g Alcalase AF 2.4 L (Novozyme, endopeptidază bacteriană din *Bacillus licheniformis*, cu subtilizină/serin endo-peptidază ca principal component enzimatic, având activitatea specifică de 2,4 unități Anson (AU) per gram. O unitate Anson este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care, în condiții standard, digeră hemoglobina cu o viteză inițială care produce într-un minut o cantitate de compuși solubili în acid tricloracetic care dau aceeași culoare cu reactivul Folin-Ciocalteu ca și 1 miliechivalent de tirozină) și 0,025 g de Flavourzyme 500 MG (Novozyme, un complex de amidopeptidaze/exopeptidaze și endo-proteaze, obținut din *Aspergillus oryzae*, cu o activitate de 500 LAPU/g. O unitate LAPU, unitate leucină aminopeptidazică, este cantitatea de enzimă care hidrolizează 1 μmol de leucin-*p*-nitroanilid/min. Orice tip de combinație de endoproteaze și amidopeptidaze/exo-proteaze poate fi folosită, cu condiția de a asigura o activitate enzimatică similară în amestec. Amestecul suspensie de drojdie – enzime este menținut timp de 16 ore, la 60°C și apoi centrifugat la 5000xg pentru îndepărtarea eventualelor resturi celulare și este ultrafiltrat printr-o membrană de 3 kDa, folosind un sistem Millipore Pelicon XL Biomax 5, 50 cm² with a Labscale TFF.

La 1 ml de permeat/ultrafiltrat sunt adăugați 3 ml de soluție 5% acid tricloracetic acid (TCA). Nu rezultă un precipitate, iar aceasta demonstrează că în permeat sunt numai aminoacizi liberi și di/ tri-peptide. Permeatul este concentrat prin evaporare sub vid până la 15% substanță uscată (determinată refractometric). Circa 75 de ml de hidrolizat enzimatic concentrat este introdus într-un balon de 250 ml cu fund plat, echipat cu condensator de reflux, pâlnie de adăugare și termorezistență pentru monitorizarea temperaturii, în care a fost transferată anterior o cantitate de 4,2255 g de carbonat de mangan(II). Adăugarea compusului insolubil de micro-element este în raport stoichiometric de 2 moli de aminoacizi la 1 mol de compus insolubil de micro-element, conform reacției :



considerând o masă moleculară medie a aminoacizilor din drojdie de 136Da.

Suspensia este amestecată energic cu un agitator magnetic și încălzită până la 45°C. Se scoate pâlnia și se introduce o sonda ultrasonică. Hidrolizatului și carbonatul de mangan (II) sunt sonicate pentru 60 min la 400 W. După

ultrasonicare excesul de compus insolubil al micro-elementului este separat prin centrifugare, iar supernatantul conținând chelați de aminoacizi este uscat prin pulverizare la 140...150°C, temperatură de intrare și 80 ... 85°C, temperatură de ieșire.

Se obține un produs care conține minimum 15% mangan, întreaga cantitate de mangan fiind chelată de aminoacizi sau di/tri-peptide. Produsul este utilizabil ca aditiv furajer sau supliment alimentar.

Exemplul 2. Se procedează ca la exemplul 1, numai că se folosesc 50 mg de carbonat de crom (III), ionul Cr^{3+} complexându-se în special cu aminoacizii liberi glicocol, acid glutamic și cisteină. Carbonatul de crom (III) se prepară prin precipitare dintr-o soluție de clorură de crom (III) cu un exces de 50% soluție de carbonat de sodiu. Peste 500 ml soluție 15% Na_2CO_3 se adaugă lent 166 g de soluție 30% CrCl_3 și sub agitare continuă și energetică (minimum 200 rpm), menținându-se temperatura între 20 și 25°C. Precipitatul format se filtrează, se spală pe filtru cu apă bidistilată până când conductivitatea apei este de sub 2 mS/cm și se usucă la etuvă sub vid la 45°C timp de 72 ore. Din compusul insolubil astfel obținut se cântăresc cu precizie cele 70 mg care se transferă cantitativ în balonul cu trei gâturi, continuându-se ca în exemplul 1. Datorită folosirii unui compus insolubil riscul ca ionii Cr^{3+} să fie prezenți în exces cu generarea de specii ionice toxice, ca de ex. Cr^{6+} , este redus.

Se obține un produs care conține min. 0,1% crom, întreaga cantitate de crom fiind chelată de aminoacizii liberi. Produsul este utilizabil ca aditiv furajer sau supliment alimentar.

Exemplul 3. Se procedează ca la exemplul 1, numai că se folosesc 35 mg de selenit de magneziu hexahidrat, ionul selenit reacționând în special cu aminoacizii/peptidele care au grupări tiolice, ca de ex. cisteina sau glutatationul. Cristalele cubice de $\text{MgSeO}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, insolubile în apă, se prepară prin adăugare lentă și treptată, sub agitare, a 44 ml acid selenios, H_2SeO_3 , puritate 98%, densitate 3,004 g/ml, și a 204 ml soluție 10% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ peste 95 ml soluție 10% Na_2CO_3 . Precipitatul format se filtrează, se spală pe filtru cu apă bidistilată până când conductivitatea apei este de sub 2 mS/cm și se usucă la etuvă sub vid la 45°C timp de 72 ore. Din compusul insolubil astfel obținut se cântăresc cu precizie cele 70 mg care se transferă cantitativ în balonul cu trei gâturi, continuându-se ca în exemplul 1. Datorită folosirii unui compus insolubil riscul ca Se^{+4} să fie redus la

seleniu elementar Se^0 , insolubil și fără biodisponibilitate, este foarte redus. Lipsa apariției culorii roșii specifice seleniului Se^0 în timpul reacției de complexare reprezintă dovada neformării seleniu elementar.

Se obține un produs care conține minimum 0,1% seleniu, întreaga cantitate de seleniu fiind chelatată de aminoacizii/peptidele cu grupări -SH. Produsul este utilizabil ca aditiv furajer.

Exemplul 4. Se procedează ca la exemplul 1, numai că se folosesc 27 g de șrot de rapiță, iar compusul greu solubil în apă care se folosește este hexaboratul dicalcic pentahidrat, $2\text{CaO} \cdot 3\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Borul reacționează în special cu aminoacizii care conțin grupări hidroxi, serină, treonină și tirozină. Compusul insolubil de bor se formează *in situ*, într-un balon cu trei gâturi de 500 ml, în care se adaugă 250 ml apă de-ionizată, 2,3765 g de acid boric și 2,72 g de hidroxid de calciu. Amestecul este încălzit la 75°C și barbotat cu CO_2 pentru circa 15 min, până când nu se mai formează precipitat. Peste compusul insolubil de bor format *in situ* se adaugă 75 ml de concentrat de aminoacizi.

Se obține un produs care conține minimum 20% bor chelatat de aminoacizi /di/tri-peptide. Produsul este utilizabil ca fertilizant foliar pentru plante.

Exemplul 5. Se procedează ca la exemplul 1, numai că se folosesc 24 g de șrot de soia, iar compusul greu solubil în apă care se folosește este oxidul de molibden. Se adaugă în balonul cu trei gâturi 0,158 g de oxid de molibden, peste care se aduce concentratul de hidrolizat proteic care conține numai aminoacizi liberi/di și tri-peptide.

Se obține un produs care conține minimum 1% molibden chelatat de aminoacizi /di/tri-peptide. Produsul este utilizabil ca aditiv furajer sau ca fertilizant foliar pentru plante.

Exemplu 6. Se procedează ca la exemplul 1, numai că se folosesc 24 g de șrot de soia, iar compusul greu solubil în apă care se folosește este carbonatul bazic de zinc, $[\text{ZnCO}_3]_2 \cdot [\text{Zn}(\text{OH})_2]_3$, produs cu minimum 53% zinc. Se adaugă în balonul cu trei gâturi 2,95 g de carbonat de zinc bazic, peste care se aduce concentratul de hidrolizat proteic care conține numai aminoacizi liberi/di și tri-peptide.

Se obține un produs care conține minimum 15% zinc chelatat de aminoacizi /di/tri-peptide. Produsul este utilizabil ca aditiv furajer sau ca fertilizant foliar pentru plante.

Exemplu 7. Se folosesc 11 g de concentrat proteic de zer, care nu se mai spală pentru îndepărtarea compușilor amari, ci se tratează direct cu lipază microbiană pentru formarea unor compuși de aromă superiori și apoi se hidrolizează cu proteaze microbiene. Concentratul de aminoacizi/peptide se aduce peste 5,76 g de oxid feric, Fe_2O_3 .

Se obține un produs care conține min. 30% fier, întreaga cantitate de fier fiind chelată de aminoacizi sau di/tri-peptide. Produsul este utilizabil ca aditiv furajer, aditiv alimentar sau supliment alimentar.

REVEDICĂRI

1. Procedeu de preparare a unor chelați ai aminoacizilor cu microelemente esențiale **caracterizat prin aceea că** cuprinde următoarele etape:

- spălarea materialului proteic cu o soluție de 5% Na₂CO₃, urmată de ultrasonarea amestecului cu 400 W timp de 20 min la 40°C, și hidroliza cu lipază microbiană la un raport 15....25 LU/g material proteic,

- hidroliza materialului proteic cu un amestec de proteaze microbiene, endoproteaze și amidopeptidaze, la pH neutru și temperatură de 55 ... 60°C, timp de 16...20 ore, urmată centrifugare la 5000xg urmată de ultrafiltrarea hidrolizatului cu îndepărtarea particulelelor cu o masă moleculară mai mare de 3 kDa;

- concentrarea prin evaporare la presiune redusă a hidrolizatului enzimatic până la 15% substanță uscată;

- adăugarea unui compus insolubil al micro-elementului esențial la un raport un raport de 1 mol compuși insolubili / greu solubili de Mn, Zn, Fe, B la 2 moli de aminoacizi totali, teoretic rezultați prin hidroliza totală a materialului proteic, 15 mM compus insolubil de molibden la 1 mol de aminoacizi, 1,75 mM compus insolubil de seleniu la 1 moli de aminoacizi, 5 mM compus insolubil de crom la 2 moli de aminoacizi și ultrasonarea amestecului cu 400 W timp de 30 min la 45°C;

- centrifugarea excesului de compus insolubil al micro-elementului și uscarea supernatantului prin pulverizare la o temperatură de intrare de 140... 145°C și o temperatură de ieșire de 80 ... 85°C.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** lipaza microbiană este selectată dintre enzima *Rhizomucor* exprimată în *Aspergillus oryzae*

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** materialul proteic este selectat dintre drojdia de bere, șrot de rapiță, șrot de soia, concentrat proteic de zer.

4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** compusul insolubil al ementului esențial este selectat dintre carbonat de mangan(II), carbonat de crom(III), selenit de magneziu hexahidrat, hexaborat dicalcic hexahidrat, oxid de molibden, carbonat bazic de zinc, oxid feric.