



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00045

(22) Data de depozit: 21/01/2016

(41) Data publicării cererii:
29/07/2016 BOPI nr. 7/2016

(71) Solicitant:
• IOSUB ION, STR. MAIOR SONTU NR. 6,
BL. D4, SC. B, AP. 10, PITEȘTI, AG, RO;
• CHIRILĂ PAVEL,
STR. EROU MIRCEA MARINESCU NR. 8,
VOLUNTARI, IF, RO

(72) Inventatori:
• IOSUB ION, STR. MAIOR SONTU NR. 6,
BL. D4, SC. B, AP. 10, PITEȘTI, AG, RO;
• PAVEL CHIRILĂ,
STR. EROU MIRCEA MARINESCU NR. 8,
VOLUNTARI, IF, RO

(54) PROCEDU ȘI INSTALAȚIE DE OBȚINERE A
CONCENTRATULUI PROTEIC DIN MIEREA DE *CALLUNA*
VULGARIS

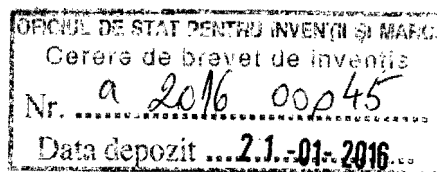
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu și la o instalație de obținere a concentratului proteic din mierea de *Calluna vulgaris*. Procedeu conform invenției constă în separarea soluției de miere prin dializă timp de 24 h, la o temperatură de 18°C, o viteză de agitare n=10 rot/min, din care se separă permeatul conținând glucidele, și retentatul conținând proteinele cu masă moleculară >3,5 kDa, sub formă de soluție coloidală, care este supusă purificării prin cromatografie cu fază inversă, rezultând un concentrat proteic purificat, din care se determină proteinele totale prin metode uzuale de

prelucrare date, proteinele enzimatică conținute în concentratul proteic separat și purificat, obținut din miere, fiind identificate prin electroforeză. Instalația conform invenției este formată dintr-un modul pentru separarea proteinelor din miere, și un modul pentru purificarea concentratului prin cromatografie cu fază inversă.

Revendicări: 3
Figuri: 3





PROCEDEU SI INSTALAȚIE DE OBTINERE A CONCENTRATULUI PROTEIC DIN MIEREA DE *CALLUNA VULGARIS*

DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la obținerea unui compus natural bogat în proteine, denumit concentrat proteic din mierea de *Calluna vulgaris* (*iarbă neagră*). Acest tip de miere prezintă o serie de calități: are un conținut relativ mai mare de proteine și polifenoli, prezintă o concentrație mai scăzută de apă și o puritate florală specifică. Deși proteinele se regăsesc în concentrații foarte reduse în miere, conferă acesteia importante proprietăți biocatalitice și imunologice. Procedul ce face obiectul acestei invenții se bazează pe separarea acestora de compușii majoritari reprezentați de glucide. Procesul de dializă asigură transferul selectiv al componentilor cu masa moleculară relativ mică în solvent (permeat), la nivelul unei membrane de celuloză regenerată și reținerea proteinelor în interiorul membranelor (retentat). Purificarea retentatului se realizează prin metode cromatografice. Concentratul proteic obținut are numeroase proprietăți bioactive ce pot fi puse în valoare, în anumite condiții de prezentare și conservare, sub forma unui compus nutraceutic eficient în ameliorarea și menținerea stării de sănătate. Mierea reprezintă un aliment natural complex cu multiple valențe benefice organismului uman. În miere sunt prezente componente majore cu rol energetic, componente minore și în urme, cu funcții complexe biocatalitice [1]. Compoziția mierii variază funcție de sortiment. Constituenții principali sunt: carbohidrații (80%), apa (17-20%). În concentrație totală mult mai mică, ce nu depășește 0,5% se regăsesc: minerale, acizi organici, polifenoli, esteri, lipide, enzime, proteine, aminoacizi, vitamine, hidroximetilfurfural, compuși volatili. Carbohidrații sunt reprezentați de monozaharide (majoritare), dizaharide, trizaharide, tetrazaharide și pentazaharide în cantități mai reduse [2]. Monozaharidele sunt reprezentate de fructoză 38% și glucoză 31%. Dizaharidele mai importante identificate sunt: sucroza, erloza, maltoza, izomaltoza, turanoza, α -, β -treholoza, gentibioza. Conținutul de apă este determinant în aprecierea calității mierii; un conținut de apă mai mare de 18% constituie un factor de risc pentru degradare prin procesele de fermentație, hidroliză sau oxidare.

Mineralele prezente în miere sunt reprezentate de: calciu, magneziu, potasiu, sodiu, fier, cupru, mangan, clor, fosfor, sulf, silice [3-4]. Acizii organici identificați în miere sunt: oxalic, formic, malic, succinic, piruvic, acetic, lactic, citric, gluconic [5]. Polifenolii sunt prezenți în miere la concentrații reduse: 46.0 – 456,0 mg/kg [6]. Aceștia sunt reprezentați de flavone, flavonoli, flavanone și flavanonoli [7]. Datorită acestora mierea poate fi considerată un antioxidant natural eficient. Adăugată în alimente mierea previne degradările oxidative ale lipidelor din carne, sau ale enzimelor din fructe și legume [8]. Esterii conținuți în miere provin din mai multe surse. Una dintre acestea poate fi reprezentată de feromonii produși de albine, componente ușor volatile din clasa metil- și etil- esterilor alifatici: palmitat, palmitoleat, oleate, stearat, linoleat, linolenat [9]. O altă sursă de esteri în miere o constituie markerii floralii: etenil-fenil-acetat, fenil-acetonitril, amino-acetofenonă, acid nonanoic, p-metil-acetofenonă, carvacrol, 8-p-mentin-1,2-diol [10], pentanal, furfural-2-etilhexanol, p-metil-acetofenonă, metil-butanal, p-cymen [11]. Lipidele sunt reprezentate de acizii grași, sterolii și fosfolipidele prezente în polenul conținut de miere. Concentrația totală de lipide în polen este cuprinsă între 5-8%. Acizii grași mai importanți din miere sunt acidul linoleic și acidul oleic [12]. Principalele enzime din miere sunt: invertaza, glucoză oxidaza, un amestec de α - și β -amilaze. Alte enzime identificate sunt catalaza, esteraza, glucozidaza, și acid fosfataza. Proteinele identificate în miere sunt reprezentate de enzime. Aceste componente au fost separate prin diferite metode cum sunt: ultracentrifugarea și electroforeza. Masele moleculare (MWCO) ale proteinelor identificate în miere sunt cuprinse între 30-300 kDa. Aminoacizii liberi au fost identificați prin metode cromatografice; cei mai importanți sunt: α - alanina, β -alanina, glicina, lisina, prolina, acidul aspartic, acidul glutamic, cisteina, serina, treonina, tirozina, valina. Principalele vitamine identificate în miere sunt: riboflavina (B2), niacin (B3), acid pantotenic (B5), vitamina B6, folat (B9) și vitamina C. Hidroximetilfurfuralul este absent în mod normal în miere, dar se regăsește ca produs secundar al degradării sau încălzirii acesteia. 5-hidroximetilfurfuralul rezultă ca produs al deshidratării catalitice a acizilor sau al degradării termice a fructozei. Prezența sa constituie principalul indicator al deteriorării mierii [13]. Componentele volatile sunt reprezentate de peste 50 de compuși dintre care cei mai importanți sunt: formaldehida, acetaldehida, izobutiralaldehida, acetona, propanolul, pentanolul, 2-metil-1-butanolul, 3-metil-1-butanolul, 3-amino-

acetofenona, nonanal, nonanol, decanal, octanal, linalool, benzaldehidă, furfural, fenilacetaldehidă, benzen, hexanol. Acești compuși sunt corelați cu producții de hidroliză a esterilor din miere [14]. Scopul general al invenției îl constituie separarea proteinelor. Separarea acestora reprezintă un proces relativ dificil datorită cantităților foarte mici (în medie cuprinse între 0,2% - 0,8 %), precum și a transformărilor rapide pe care le suferă proteinele sub acțiunea unor factori fizici, chimici sau a agenților microbieni. Creșterea temperaturii peste 40°C, sau diluția cu apă reprezintă factori de risc ce pot declanșa denaturarea proteinelor sau hidroliza acestora până la aminoacizi.

Tehnicile de separare a proteinelor din miere se bazează pe diluția cu apă distilată a materiei prime, având în vedere vâscozitatea foarte mare a acesteia. Pentru separarea proteinelor din miere sunt utilizate în general următoarele metode: dializa, cromatografia, ultrafiltrarea, electroforeza. Metoda de separare prin dializă prezintă avantajul de a proteja integritatea structurală a componentelor proteice din miere și posibilitatea de a le selecta funcție de masa moleculară. Principalul dezavantaj îl reprezintă volumul mare de soluție necesar și relativa dificultate de reducere a acestuia în produsul final. Durata relativ mare a procesului de dializă constituie un dezavantaj deoarece poate favoriza degradarea microbiană a proteinelor sau transformarea ireversibilă a acestora. Tehnica de separare a proteinelor de carbohidrați prin filtrare cu geluri poate fi considerată eficientă, însă prezintă dezavantajul aplicării restrânse pentru cantități mici de probă. Condițiile de separare se pot modifica în timp și nu poate fi controlat. Cromatografia cu schimb ionic are avantajul de a separa componentele proteice, mai vâscoase, de carbohidrați care sunt eliminați mai ușor prin spălarea coloanei cromatografice cu eluenți hidrofilii. Extracția totală a proteinelor prin această metodă nu este posibilă datorită adsorbției slabe a acestor macromolecule pe faza staționară, reprezentată de rășinile schimbătoare de ioni. În concentratul proteic separat și purificat au fost identificate aproximativ 20 de benzi specifice proteinelor, prin metoda electroforezei pe gel de poliacrilamidă SDS-PAGE. Dintre acestea cele mai importante sunt proteinele cu rol enzimatic: diastază (amilază) ce are masa MWCO 67 kDa, invertază MWCO = 270 kDa, α - și β -glucozidază, glucoză oxidază MWCO = 160kDa, apalbumină MWCO = 55 kDa și glucoză transferază MWCO = 53 kDa, [15]. Apalbumina este o glicoproteină care a fost determinată frecvent în diferite sortimente

de miere [16-17]. Invertaza reprezintă enzima ce catalizează conversia zaharozei din miere în glucoză și fructoză. Amilaza reprezintă o proteină cu rol enzimatic ce are ca principală acțiune catalitică degradarea oligozaharidelor la monozaharide (hidroliza amidonului până la dextrină și maltoză). Această transformare este corelată cu creșterea concentrației de glucoză și fructoză și cu o scădere treptată în conținutul de apă [18]. Glucoză oxidaza și catalaza sunt enzime care sunt implicate în producția și eliminarea apei oxigenate, principalul agent antibacterian din miere [19]. Glucoză oxidaza este o glicoproteină ce conține două subunități identice cu masa de 80 kDa. Catalaza este enzima cu MWCO 250kDa ce catalizează transformarea apei oxigenate în apă și oxigen [20]. Proteaza hidrolizează proteinele și polipeptidele în alte peptide cu mase moleculare mai mici. Această enzimă are MWCO cuprins între 16-18 kDa, funcție de tipul de activitate proteolitică cercetată [21]. β -Glucozidaza este enzima ce transformă β -glucanii în glucoză și oligozaharide. Acid fosfataza reprezintă enzima cu MWCO 57 kDa care are capacitatea să elimine grupările fosfat din compușii organofosfatați [22]. Esteraza este enzima din miere specializată în ruperea legăturilor ester. Această enzimă are MWCO cuprins între 81-91 kDa [23]. Separarea și identificarea acestor enzime poate reprezenta o etapă inițială de caracterizare a bioactivității sortimentelor variate de miere. Conținutul relativ ridicat de proteine cu rol enzimatic constituie un indicator superior de calitate în menținerea și ameliorarea stării de sănătate. Procedul de obținere a concentratului proteic ce constituie obiectul invenției conține mai multe etape. Schema etapelor procesului de separare și purificare a concentratului proteic este prezentată în fig.1. Prima etapă se referă la pregătirea soluției de miere în vederea separării prin dializă. Această pregătire constă în operații de măsurare a maselor și a volumelor de materii prime necesare: miere și apă dublu distilată, amestecare și dizolvare, filtrare. Cantitățile de materie primă sunt corelate și dimensionate în raport cu parametrii membranei utilizate în dializă. Aceasta are formă de tub cu capacitatea de 90 ml/10 cm lungime. Etapa a doua este reprezentată de procesul de separare prin dializă a proteinelor de glucide și alți compuși cu masă moleculară mai mică decât 3,5 kDa. Au fost stabilite condițiile de corelare a capacității de încărcare cu integritatea fizică a membranei, pe durata unui ciclu de separare în condițiile agitării mecanice. A fost determinat raportul optim dintre volumul inițial al

soluției de miere și volumul solventului, reprezentat de apa dublu distilată (cu o conductivitate de maxim $4 \mu\text{Scm}^{-1}$), pentru o separare eficientă a proteinelor. Au fost determinate valorile parametrilor: temperatură, viteză de agitare, timp de dializă pentru o separare cât mai completă. A fost elaborată o metodă refractometrică de monitorizare a concentrației glucidelor din permeat și a fost propusă o procedură de identificare a finalizării separării. Etapa a treia este reprezentată de purificarea prin metode cromatografice a concentratelor proteice brute obținute în etapa anterioară. În acest scop a fost utilizată o metodă de separare cromatografică cu fază inversă. A fost selectată o fază solidă eficientă în separarea compușilor cu hidrofobicitate scăzută din soluții apoase, cum sunt proteinele. Această fază staționară este puternic hidrofobă: C18 - silan monofuncțional $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}_{18}\text{H}_{37}$. Au fost identificate și aplicate proceduri cromatografice eficiente pentru secvențele procesului cromatografic HPLC. Acestea sunt corelate cu: alegerea eluenților și a gradientului de polaritate, selectarea timpului de eluție, a presiunii și a temperaturii de lucru, identificarea volumelor optime pentru probe și solvenți. Procesul de purificare a proteinelor este monitorizat prin metode spectrofotometrice prin înregistrarea spectrelor de absorbție în domeniul UV, cu ajutorul unui spectrofotometru cu fibră optică și celulă de flux. Aceasta monitorizare permite alegerea parametrilor optimi cu privire la: ordinea și debitului eluenților, gradientului de polaritate în coloana de separare și durata procesului. Pe măsură ce purificarea avansează se constată o diminuare a numărului benzilor de absorbție în spectrul UV. Absența acestora în regiunea spectrului cu lungimi de undă mai mari de 300 nm reprezintă un indiciu al finalizării procesului de purificare. Etapa a patra este destinată prelucrării datelor în scopul evaluării procesului de separare și purificare. Au fost utilizate metodele Lowry și Warburg-Christian pentru determinarea proteinelor totale din concentratul proteic purificat. Rezultatele au fost exprimate în corelație cu etaloane specifice de proteine. Au fost elaborate metode de prelucrare a datelor experimentale în scopul evaluării randamentului separării. Instalația utilizată pentru obținerea concentratului proteic care face obiectul invenției, are două componente: modul pentru separarea proteinelor din miere prin dializă și modul pentru purificarea prin cromatografie cu fază inversă C18 a concentratului. Schema modul pentru separarea proteinelor din miere prin dializă este descrisă în fig.2. Acesta este format dintr-un

agitator mecanic (1), cu 10 rotații /minut; recipient de sticlă (2) cu un volum $V= 50$ l în care se află inițial apă dublu distilată, cu o conductivitate mai mică de $4\mu\text{Scm}^{-1}$ (3); proba supusă separării este reprezentată de filtratul obținut în prima etapă, aceasta este conținută în membrana semipermeabilă din celuloză regenerată cu MWCO =3,5 kDa (4) cu volum $V= 0,50$ l; suport (5); lampa cu lumină UV (6) utilizată în scopul evitării contaminării microbiene. Periodic sunt analizate refractometric probe din permeat în vederea monitorizării glucidelor. Stabilirea indicelui de refracție la valoarea maximă constantă de 1,5369, în condițiile experimentale descrise, indică finalizarea separării. Schema instalației pentru modulul utilizat în scopul purificării prin cromatografie cu fază inversă C18 a concentratului brut este prezentată în fig.3. Instalația se compune din coloana cromatografică (2), cu faza inversată C₁₈; racorduri de teflon pentru fluxul de eluenți (1); conexiune la instalația de vid (3); celulă de flux pentru monitorizarea spectrofotometrică (4); recipienti pentru colectarea fracțiilor (5); robineti de selectare/acces a solventilor în coloana cromatografică (6); recipienti rezervor pentru eluenți (7). Eluatul este monitorizat prin înregistrarea spectrelor de absorbție în domeniul UV, cu ajutorul unui spectrofotometru cu fibră optică și celulă de flux. Rezultatele obținute pentru concentratul proteic din mierea de *Calluna vulgaris*, au prezentat un conținut mediu de proteine foarte ridicat, în medie de 1,8 %, comparativ cu valorile obținute în cazul altor sortimente de miere (0,2%-0,8%). Acest fapt constituie un argument justificat în aprecierea calității sortimentului de miere de *Calluna vulgaris* din punct de vedere curativ. Astfel, procedeul descris de invenție permite determinarea conținutului total de proteine și din alte sortimente de miere, în vederea evidențierii și a ierarhizării calităților bioactive. Prin metode electroforetice SDS PAGE au fost identificate principalele enzime ale mierii din *Calluna vulgaris* în conținutul concentratului proteic. Procedeul ce face obiectul invenției poate constitui o bază de pornire în realizarea și valorificarea la scara industrială a unui produs nutraceutic sau farmaceutic. Invenția vine și în ajutorul apicultorilor, sau a specialiștilor în procesarea mierii, pentru promovarea calității sortimentelor de miere bazată pe conținutul de proteine.

REVENDICĂRI

1- Procedeu de separare și concentrare a proteinelor conținute în mierea de *Calluna vulgaris* (iarba neagră) caracterizat prin aceea că se referă la obținerea unui produs denumit: **concentrat proteic din miere de *Calluna vulgaris* (iarba neagră)**. Acesta este produsul final al etapelor de procesare fizico-chimică a mierii, de separare prin dializa și de purificare prin metode cromatografice a concentratului proteic. Acesta se obține sub forma unei soluții hidroetanolice cu un conținut de 50% amestec proteine. În prima etapă s-au determinat parametrii optimi pentru separare: volumul maxim de încărcare a membranei selective în corelație cu integritatea fizică a acesteia, în condițiile agitării mecanice pe durata unui ciclu de separare; a fost stabilit raportul dintre volumul inițial al soluției de miere și volumul solventului, reprezentat de apa dublu distilată cu o conductivitate de maxim $4 \mu\text{Scm}^{-1}$, pentru separarea eficientă a proteinelor: 1/100 (V/V); au fost determinate valorile parametrilor: temperatură $t = 18^\circ\text{C}$, viteza de agitare $n = 10$ rot./min, timp de dializă pentru o separare completă $t = 24$ ore. În timpul dializei se prelevează periodic probe din permeat care sunt analizate refractometric din punct de vedere al prezenței glucidelor. Corelația dintre concentrația glucidelor acumulate în permeat în timpul dializei și indicele de refracție arată o dependență liniară, cu excepția etapei finale. Separarea este considerată finalizată în momentul în care concentrația glucidelor din permeat rămâne constantă și corespunde valorii maxime a indicelui de refracție ($n_{(\text{max})} = 1,5369$ în condițiile experimentale descrise). Retentatul, care conține proteinele cu MWCO > 3,5 kDa, se prezintă sub forma unei soluții coloidale cu omogenitate relativă. În etapa următoare aceasta este supus purificării prin cromatografie cu fază inversă, în scopul obținerii concentratului proteic. A fost selectată faza solidă C18: silan monofuncțional $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ în scopul separării eficiente din soluții apoase a compușilor cu hidrofobicitate scăzută, cum sunt proteinele. Eluenții utilizați au fost selectați pe baza unor diferențe adecvate de polaritate: apă bidistilată/etanol și a fost determinat gradientul de polaritate optim purificării. Alți parametri cum sunt: timpul de eluție, presiunea și temperatura de lucru; volumele optime pentru probe și solvenți s-au determinat prin monitorizarea spectrofotometrică a eluatului. Acest procedeu poate constitui baza de pornire în valorificarea concentratului

proteic ca produs nutraceutic sau farmaceutic, datorită proprietăților sale bioactive determinate de prezența principalelor enzime conținute de mierea de *Calluna vulgaris*.

2- Instalație pentru aplicarea procedurii descris în revendicarea 1, caracterizată prin aceea că este formată din două părți: modul pentru separarea proteinelor din miere prin dializă și modul pentru purificarea prin cromatografie cu fază inversă C18 a concentratului. Modulul destinat obținerii concentratului proteic brut prin dializă este caracterizat prin aceea că realizează o separare monitorizată refractometric fig.2. Astfel, prin prelevarea succesivă de probe, este posibilă determinarea continuă a creșterii concentrației glucidelor în permeat, respectiv a concentrării proteinelor în retentat. Etapa de separare a proteinelor de glucide cu MWCO < 3,5 kDa, poate fi considerată finalizată prin identificarea momentului în care indicele de refracție al permeatului rămâne constant la valoarea sa maximă. Modulul destinat purificării concentratului brut prin cromatografie cu fază inversă C18 este caracterizat prin aceea că realizează o purificare avansată a proteinelor prin monitorizare spectrofotometrică fig.3. Eluatul este monitorizat prin înregistrarea spectrelor de absorbție în domeniul UV, cu ajutorul unui spectrofotometru cu fibră optică și celulă de flux. Pe măsură ce purificarea avansează se constată descreșterea numărului benzilor de absorbție din spectrul UV; absența acestor benzi în regiunea spectrului cu lungimi de undă mai mari de 300 nm, este corelată cu finalizarea procesului de purificare a concentratului proteic. Aceasta monitorizare permite alegerea parametrilor optimi cu privire la: ordinea și debitului eluenților, gradientului de polaritate în coloana de separare și durata procesului.

3- Procedul și instalația sunt caracterizate prin aceea că permit valorificarea invenției ca metodă de estimare a potențialului bioactiv specific proteinelor, pentru sortimentele de miere.

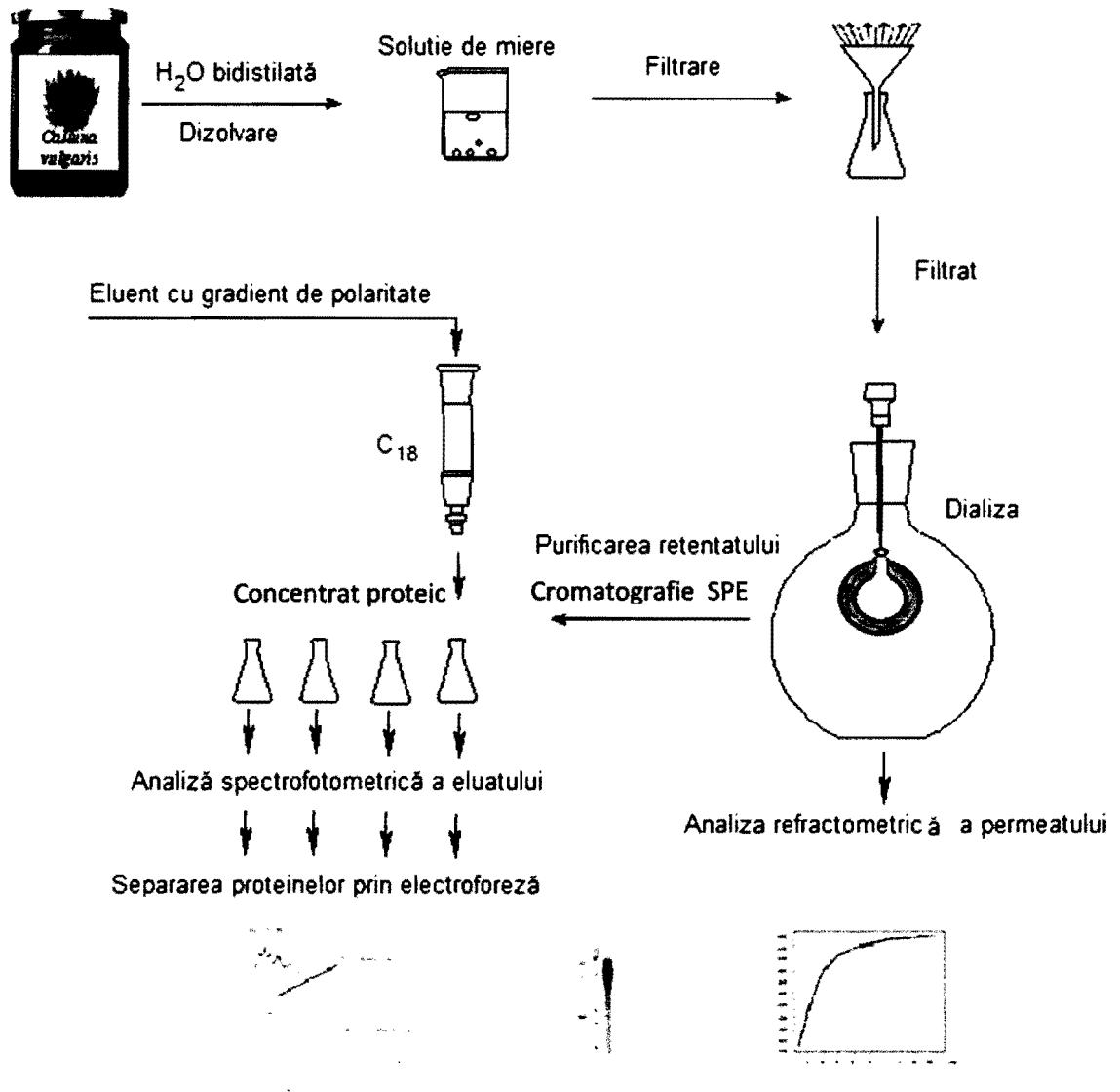


Fig.1.

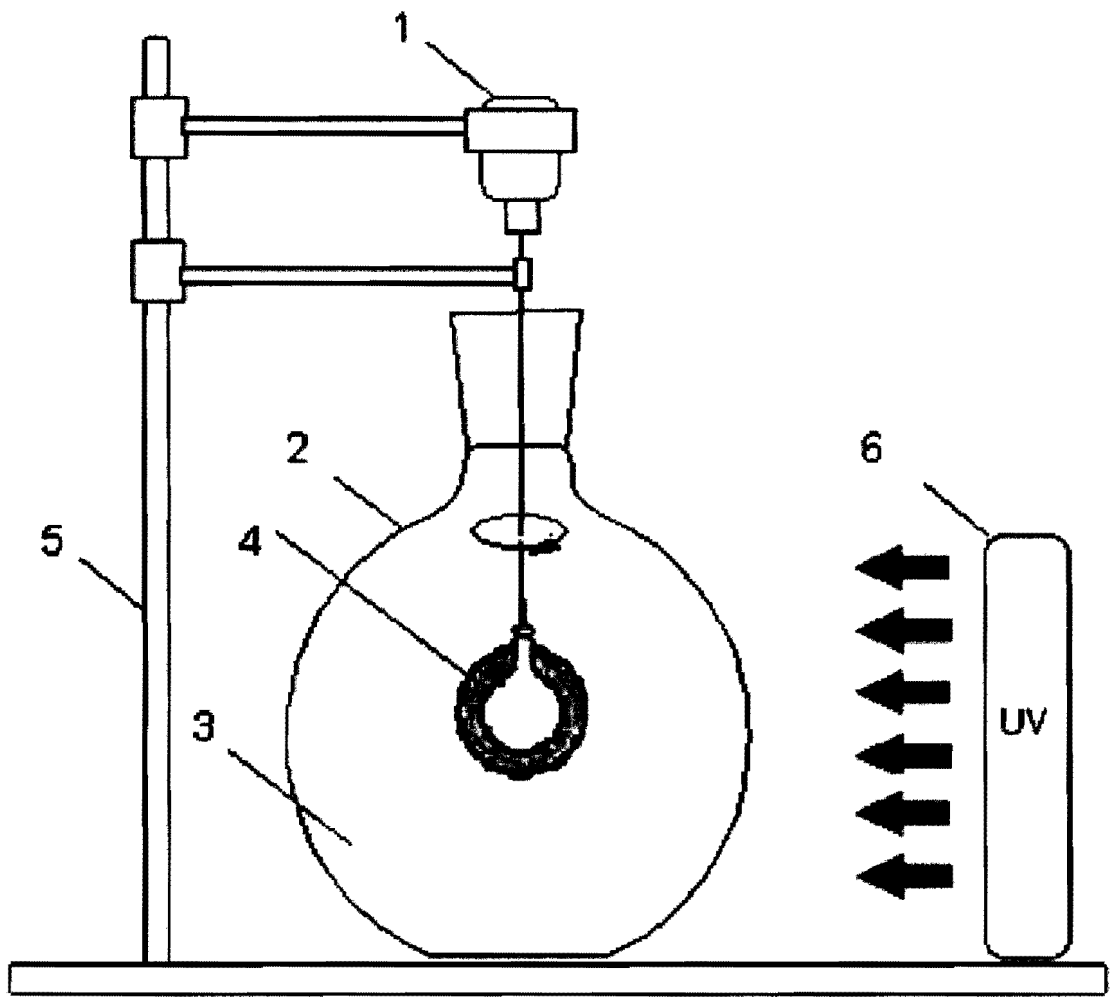


Fig.2.

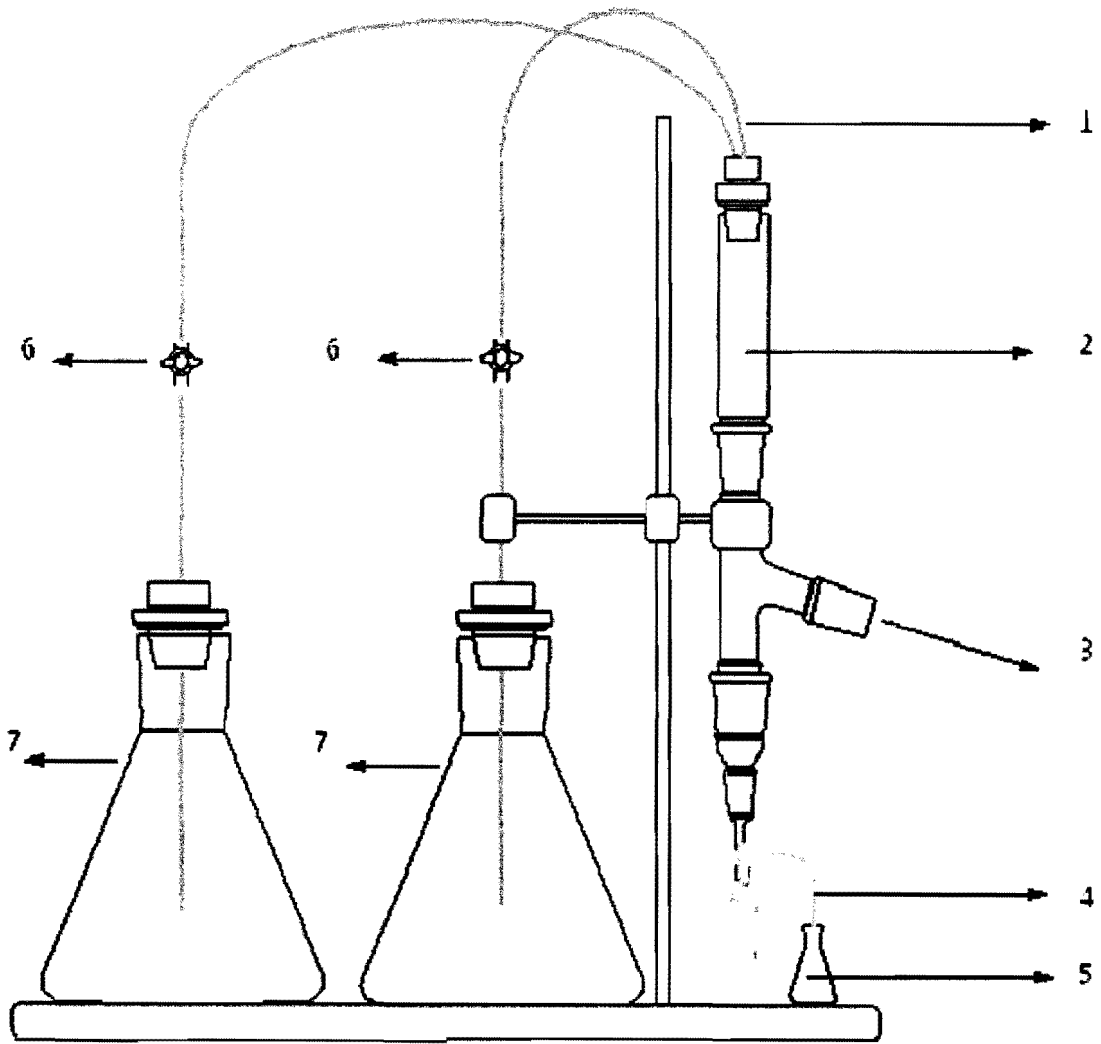


Fig.3.