



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00659

(22) Data de depozit: 22/10/2020

(41) Data publicării cererii:
29/04/2022 BOPI nr. 4/2022

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE,
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR. 296, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• MEDICA FARMIMPEX S.R.L.,
STR.FRASINULUI NR.11, OTOPENI, IF, RO

(72) Inventatori:
• OANCEA ANCA OLGUȚA, STR.PAȘCANI,
NR.5, BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• MOLDOVAN LUCIA,
BD.CONSTRUCTORILOR NR.24A, BL.19,
SC.A, ET.2, AP.13, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• TOMA AGNES ELENA,
STR. DRUMUL BACRIULUI NR. 40A, AP. 4,
SAT ROȘU, COMUNA CHIAJNA, IF, RO;
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MORARU ANGELA, STR. PETRICANI
NR. 1R, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• COROIU VIORICA,
STR.DEALUL ȚUGULEA NR.46-50, BL.12,
SC.B, AP.50, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) HIDROLIZAT PROTEIC CU PROPRIETĂȚI BIOACTIVE
IZOLAT DIN SUBPRODUSE DE PEȘTE ȘI PROCEDEU
DE OBȚINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții de hidrolizate proteice cu aplicabilitate în industria farmaceutică și cosmetică. Procedeu, constă în extracția peptidelor bioactive din subproduse de pește prin tratamente de decalcifiere și delipidizare a țesutului, hidroliza enzimatică, cu una sau două enzime succesiv, respectiv, flavourzimă și/sau alcalază, urmată de decolorarea extractului, ultrafiltrare tangențială și

uscare prin atomizare, rezultând o compoziție sub formă de pulbere având un conținut de peste 85% proteină, până la 2% lipide, respectiv, 1,5% cenușă, o greutate moleculară de până la 3000 Da care prezintă proprietăți bioactive, respectiv activitate antioxidantă, antiproliferativă și antihipertensivă.

Revendicări: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).

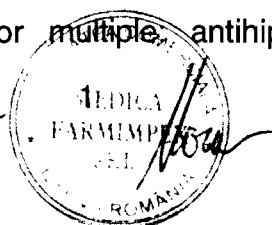


HIDROLIZAT PROTEIC CU PROPRIETĂȚI BIOACTIVE IZOLAT DIN SUBPRODUSE DE PEȘTE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Prezenta invenție se referă la un hidrolizat proteic, compus din peptide de greutate moleculară mică, cu proprietăți bioactive (antioxidante, antihipertensive antiproliferative) izolat din subproduse de pește, oase, piele, carne, viscere, și la procedeul de obținere al acestuia. Invenția are aplicabilitate în domeniul industriei farmaceutice, cosmetice și nutraceutice.

În ultima perioadă se constată un interes crescut privind obținerea de hidrolizate proteice din pește cu proprietăți bioactive prin valorificarea de diverse surse reziduale (Halim et al. *Trends in Food Sciences and Technology*, 2016, 51:24-33). Subprodusele rezultate în urma prelucrării peștilor sunt resurse cu valoare comercială neglijabilă și reprezintă o cauză majoră de poluare a mediului. În scopul valorificării acestor bioresurse s-au dezvoltat procedee de hidroliză pentru a converti proteinele de pește din materialele neutilizate (cap, piele, viscere, oase, etc) în forme acceptate de piață care pot fi utilizate pe scară largă și în alte domenii decât hrana pentru animale sau fertilizatori (Villamil et al., *Food Chemistry*, 2017, 224:160-171; Gildberg et al., *Process Biochemistry*, 1994, 28:1-15).

Se cunoaște că hidrolizatele de pește reprezintă o sursă sigură de proteină pentru nutriție datorită compoziției în aminoacizi și efectului pozitiv asupra absorbției gastrointestinale (Benjakul et al., *Fish protein hydrolysates: production, bioactivities, and applications*, în *Antioxidant and Functional Components in Aquatic Foods*, Kristinsson ed., 2014, pg. 237-272). Metodele de obținere a acestor hidrolizate care implică transformarea proteinelor în peptide, pot fi chimice sau enzimatic și produc peptide cu proprietăți funcționale diferite și bioactivități comparabile cu omologii nativi (Kristinsson și Rasco, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2000, 40: 43–81). Tehnologiile enzimatic de recuperare a proteinelor din deșeurile de pește sunt mai eficiente comparativ cu cele chimice, deoarece procesul de hidroliză este mai ușor de controlat, necesitând condiții mai blânde de lucru. De asemenea, utilizarea enzimelor determină un grad ridicat de hidroliză și asigură formarea de peptide solubile, cu valoare nutrițională ridicată, proprietăți structurale utile pentru alimentele nutraceutice și proprietăți funcționale de interes biomedical. Peptidele bioactive rezultate din hidroliza enzimatică a proteinelor din pește sunt implicate în diferite funcții biologice datorită activităților multiple, antihipertensive datorită inhibării



enzimei de conversie a angiotensinei (ACE), antioxidante, anticoagulante și antimicrobiene (Ngo et al., *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 51:378-383). Subprodusele piscicole pot fi și surse de compuși antitumorali sau chemopreventivi (Picot et al., *Process Biochemistry*, 2006, 41:1217-1222).

Sunt cunoscute o serie de procedee de obținere a produselor pe bază de peptide extrase din diverse surse de pește cu aplicații industriale. Astfel, brevetul US6753407 B2 se referă la obținerea de 2 peptide, izolate din branhiile de pește oceanic (biban vărgat hibrid *Morone saxatilis* × *Morone chrysops*), care prezintă proprietăți antimicrobiene – de ex. activitatea bactericidă față de *E coli*. Cererea de brevet CN 101294185 A protejează o metodă de preparare a peptidelor de colagen din solzi de pește, în care se utilizează fermentația cu un amestec de tulpini de microorganisme aparținând diferitelor genuri (*Bacillus*, *Aspergillus*, *Streptomyces*, *Trichoderma*). Peptidele rezultate sunt utilizate pentru obținerea de produse destinate nutriției și îngrijirii sănătății.

Cererea de brevet CN1383732 A descrie o tehnologie de preparare a unui amestec de peptide din pește prin utilizarea a 2 enzime, respectiv pancreatina și pepsina. Peptidele obținute prezintă proprietăți antibacteriene și de reglare imunologică și sunt ușor de digerat și asimilat. Cererea de brevet EP2766383 B1 prezintă un procedeu enzimatic de obținere a peptidelor de masă moleculară mică și conținut scăzut în cenușă, pornind de la gelatină fabricată din piele și oase de pește. Gelatina este descompusă în peptide cu masă moleculară mică folosind enzime de la *Bacillus* sp. Soluția de gelatină este clarificată prin filtrare, după ajustarea pH-ului la 7, cu hidroxid de sodiu sau de amoniu. Soluția filtrată este desalinizată la o temperatură de 20 până la 55°C într-un mod de diafiltrare, până când conținutul de sare scade sub 0,05% (masă / volum). Produsul astfel obținut este hidrolizat cu o protează bacteriană, de preferat din *Bacillus licheniformis*, menținându-se pH-ul în intervalul de la 7 la 10 și temperatura în intervalul de la 25 la 75°C. Produsul hidrolizat este filtrat prin membrană de ultrafiltrare la temperatura cuprinsă între 15 și 55°C, iar permeatul este concentrat la o temperatură cuprinsă între 50 și 100°C, sub vid, pentru a obține soluția peptidică conform invenției.

Un principal dezavantaj al hidrolizatelor de pește este gustul amar, care limitează utilizarea pentru alimente funcționale și formulări buvabile (Dauksas et al., *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2004, 13(2) 101-114). Pentru a înlătura gustul amar au fost propuse diferite tipuri de procedee, cererea de brevet SG



Nobhi

10201806926Y descrie mascarea gustului amar al peptidelor produse prin hidroliza enzimatică a proteinelor din pește prin utilizarea glicerofosfolipidelor. Brevetul JP 3483875 B2 prezintă un procedeu de extracție cu etanol 10% a peptidelor rezultate prin hidroliză cu o proteză alcalină a proteinelor din pește. Brevetul KR 101415225 se referă la un procedeu în care sunt utilizate pentru hidroliza colagenului o combinație de proteine, o protează bacteriană și una fungică, urmată de o separare cromatografică pe coloană. Brevetul US6905704 protejează un procedeu prin care se purifică preponderent peptide care conțin secvența valină (Val) – tirozină (Tyr), cu activitate de inhibare a ACE. Procedeu include purificarea peptidelor prin cromatografie de lichide în fază inversă, folosind o fază staționară cu grupări octadecilsilil (ODS).

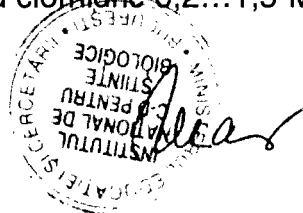
Toate aceste procedee cunoscute pentru înlăturarea gustului amar afectează însă și activitatea biologică a peptidelor (Idowu și Benjakul, *Journal of food biochemistry*, 2019, 43(9), e12978).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție de peptide din proteine din pește, cu un grad mare de puritate, greutate moleculară mai mică de 3000 Da, gust amar redus și proprietăți bioactive, respectiv activitate antioxidantă, antiproliferativă și antihipertensivă, reproductibile.

Hidrolizatul proteic obținut, conform invenției, este o pulbere de culoare alb-gălbuie, care are un gust amar redus și un conținut în peptide cu masa moleculară medie mai mică de 3000 Da de peste 85% și care prezintă următoarele proprietăți bioactive: activitatea antioxidantă de neutralizare a radicalilor liberi 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) de cel puțin 60%, antihipertensivă - de inhibare a enzimei de conversie a angiotensinei - de cel puțin 50% și activitate antitumorală, de inhibare a creșterii celulelor de tip Hep 2 de cel puțin 60%.

Procedeu de obținere a hidrolizatului proteic de pește, conform invenției, constă în următoarele etape:

- spălarea intensă a unei cantități de 100...1000 g subproduse de pește, cu apă de robinet, în flux continuu, timp de 1...3 ore, apoi cu apă distilată, timp de 30...50 min;
- mărunțirea mecanică a țesutului spălat cu ajutorul unei mașini electrice de tocat carne cu sită de 3 mm, urmată de decalcifierea țesutului mărunțit prin tratare cu o soluție de acid clorhidric 0,2...1,5 M, timp de 4...24 ore, în raport de puritate țesut



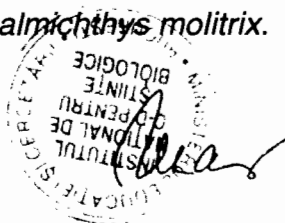
3



umed: soluție de decalcifiere de 1:10...1:40, la temperatura camerei, cu agitare ușoară continuă;

- separarea prin filtrare a țesutul decalcifiat, urmată de spălare intensă cu apă timp de 1...3 ore, scurgerea excesului de apă și delipidizare prin tratare cu 4...10 volume de amestec acetonă/ apă distilată 1:1, timp de 4...20 h, la temp. camerei, sau cu 1...4 volume izopropanol, la temp. de 30...70°C, timp de 1...10 ore, cu agitare;
- spălarea cu apă în flux continuu a țesutului delipidizat, pentru eliminarea urmelor de grăsime, amestecarea cu apă distilată rece, în raport 1:2...1:5 (g/vol), omogenizare 2...5 min la 500...2000 rpm și tratarea cu 3...5 volume soluție hidroxid de sodiu 0,1 M, timp de 1...4 ore, cu agitare la rece;
- separarea sedimentului de țesut din omogenat prin centrifugare la 2000...5000 rpm, timp de 20...40 min și înlăturarea supernatantului;
- spălarea intensă a țesutului obținut după tratamentul alcalin;
- hidroliza enzimatică prin tratare cu proteaze microbiene, dizolvate în prealabil în 6...10 volume tampon fosfat 0,2M, pH 7,0...8,5, în raport de greutate enzimă: substrat de 1:20...1:60, la 50...70°C, timp de 1...8 ore;
- inactivarea enzimelor prin încălzirea extractul la 90...100°C, timp de 10...30 min, urmată de răcire și separarea țesutului ne-extras prin centrifugare la 3000...5000 rpm, timp de 30...50 min, ajustarea pH-ului la valoarea 7,0 cu soluții concentrate de hidroxid de sodiu sau acid clorhidric și tratarea cu cărbune animal activ 0,5...2,0%, prin amestecare și agitare ușoară, timp de 2...15 ore, la temperatura camerei;
- decantarea cărbunelui activ, urmată de ultrafiltrarea tangențială, prin folosirea unei membrane filtrante cu fibre de polisulfonă, cu limita de excludere a maselor moleculare de 3000 Da;
- concentrarea soluției rezultată după filtrare la 10...20 % substanță uscată și uscarea prin pulverizare, la 130-145 °C temperatură de intrare și 80°C temperatură de ieșire.

Subprodusele de pește pot fi resturi de piele, oase, carne și viscere, separate sau în amestec inițial, și provin de preferință de la ciprinidele de crescătorie, crap *Cyprinus carpio*, novac, *Arystichtys nobilis*, cteno, *Ctenopharingodon idella*, sânger / fitofag, *Hypophthalmichthys molitrix*.



Enzimele folosite sunt subtilizina A, o serin endo-peptidază produsă de *Bacillus licheniformis*, și/sau un amestec de aminopeptidaze, dipeptilpeptidaze și endo-peptidaze produs de *Aspergillus oryzae*.

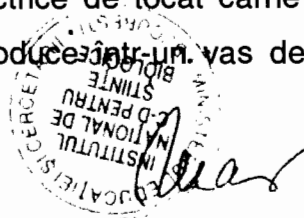
Invenția prezintă următoarele avantaje:

- procedeul descris în prezenta propunere constituie o metodă optimă de obținere a peptidelor cu greutate moleculară mică, grad ridicat de puritate din subproduse de pește (piele, os, carne, viscere) și fără gust amar;
- reducerea formării gustului amar este datorat utilizării în prima etapă de hidroliză enzimatică a unui amestec de peptidaze, aminopeptidaze, dipeptilpeptidaze și endo-peptidaze, care limitează formarea peptidelor amare din pește;
- procedeul de obținere este fezabil și nu necesită folosirea unor substanțe agresive și a echipamentelor cu grad ridicat de complexitate;
- utilizarea a două enzime pentru hidroliza deșeurilor de pește permite clivarea lanțului proteic la situsuri specifice acestor enzime în condiții moderate și controlate de lucru (temperatură, pH, timp de extracție, etc);
- peptidele de pește obținute și testate *in vitro* prezintă proprietăți bioactive definite și reproductibile, respectiv capacitate antioxidantă, activitate antiproliferativă și antihipertensivă;
- procedeul propus realizează o valorificare superioară și eficientă a subproduselor rezultate în procesele de procesare a peștilor și reduce poluarea mediului;
- produsul condiționat sub formă de pulbere solubilă, de puritate mare, poate fi utilizat pentru dezvoltarea de noi formulări cu aplicații în industria farmaceutică și nutraceutică;
- procedeul propus reduce poluarea mediului înconjurător cu deșeuri rezultate în industria procesatoare de pește.

Prezenta propunere de invenție se evidențiază prin următoarele exemple:

Exemplul 1

O cantitate de 200 g amestec de oase și carne de crap, *Cyprinus carpio*, se spală cu apă de robinet, în flux continuu, timp de 3 ore, apoi cu apă distilată, timp de 30 min, după care țesutul spălat se mărunțește mecanic cu ajutorul unei mașini electrice de tocat carne cu sită de 3 mm. Pentru decongelare, țesutul mărunțit se introduce într-un vas de laborator prevăzut cu agitator, pește care se

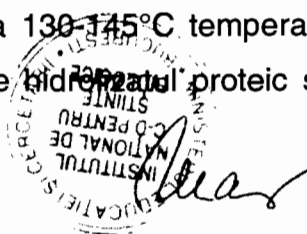


adaugă 2000 ml de soluție HCl 0,2 M, timp de 24 ore, la temperatura camerei, cu agitare ușoară. Soluția de decalcifiere se îndepărtează prin filtrare iar țesutul rezultat se spală intens cu apă în flux continuu, timp de 2 ore și apoi 30 min cu apă distilată. După spălare, peste țesutul decalcificat și spălat se adaugă 1200 ml amestec acetonă/ apă distilată 1:1 în vederea delipidizării și se agită timp de 12 ore. Țesutul obținut după filtrare prin filtru textil, se spală cu apă în flux continuu, pentru eliminarea urmelor de grăsime și apoi se introduce într-un vas de inox prevăzut cu agitator, în care se adaugă și 200 ml apă distilată rece și se omogenizează timp de 5 min la o turație de 500 rpm.

Separat se prepară 1000 ml soluție NaOH 0,1M care se introduce peste omogenatul preparat mai înainte și se agită la rece timp de 3 ore pentru îndepărtarea componentelor glucidice din structura țesutului. După tratamentul alcalin amestecul se centrifughează la 4000 rpm, timp de 20 min și se îndepărtează supernatantul. Țesutul separat prin centrifugare se spală intens cu apă timp de 2 ore și apoi cu apă distilată 30 min, după care se procesează prin hidroliza enzimatică.

Într-un vas de inox se introduce țesutul spălat peste care se adaugă sub agitare 200 ml Tampon fosfat 0,2 M pH 7,0 în care s-au dizolvat în prealabil 0,006 g Flavourzyme® (Novozymes, Bagsværd, Danemarca), un amestec de peptidaze, aminopeptidaze, dipeptilpeptidaze și endo-peptidaze produs de *Aspergillus oryzae* (Merz et al., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), 5682-5693). Activitatea amestecului enzimatic folosit este de 500 LAPU/g. O unitate LAPU este acea cantitate de enzimă care hidrolizează 1 μmol de L-leucină-p-nitroanilidă pe minut. Orice fel de amestec de enzime cu aceleași caracteristici se poate folosi.

Hidroliza enzimatică are loc la temperatura de 55°C, timp de 6 ore după care extractul obținut se încălzește la 90°C, timp de 20 min, pentru stoparea reacției enzimatică. Apoi, hidrolizatului se răcește, se centrifughează la 5000 rpm timp de 30 min iar supernatantul obținut se recuperează și se amestecă cu 20 g cărbune animal activ cu care se lasă în contact timp de 3 ore. După decantare, soluția decolorată se ultrafiltrează prin filtrare tangențială cu ajutorul unei membrane cu fibre de polisulfonă, cu limită de excludere a maselor moleculare de 3000 Da. Se recuperează permeatul, reprezentat de soluția de greutate moleculară mai mică de 3000 Da, care se concentrează la vid până la 12% substanța uscată și se usucă prin pulverizare, la 130-145°C temperatură de intrare și 80°C temperatură de ieșire. În final se obține hidrolizat proteic sub formă de pulbere de culoare albă gălbuie cu



greutatea moleculară medie sub 3000 Da, cu un conținut de 85% proteină, 1,8 % lipide și 1,2 % cenușă.

Exemplul 2

Etapele preliminare de spălare a țesutului: mărunțire, decalcifiere, delipidizare și tratament alcalin sunt similare cu cele prezentate în exemplul 1, cu deosebirea că delipidizarea se face cu 800 ml izopropanol la temperatura de 40°C, timp de 5 ore. Tratamentul enzimatic se realizează cu Alcalase® (Novozymes, Bagsværd, Danemarca) care se prepară prin dizolvarea a 0,005 g enzimă în 250 ml tampon fosfat 0,2 M pH 8,0 și se adaugă peste țesutul rezultat din etapa de tratament alcalin. Alcalase este o serin endo-peptidază de tip subtilizina A, produsă de *Bacillus licheniformis*. Enzima utilizată avea o activitate de 0,75 unități Anson per gram. O unitate Anson este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care eliberează 1,0 μmol L-tirozină din hemoglobină pe minut la 25°C, pH 7,5.

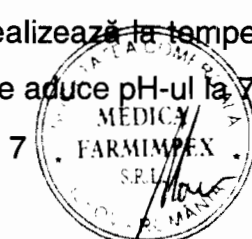
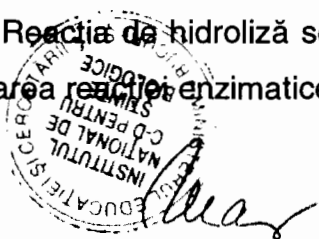
Reacția de hidroliză are loc la temperatura de 60°C timp de 5 ore. Etapele de stopare a reacției enzimatice, centrifugarea, tratamentul cu cărbune activ și ultrafiltrarea se fac în condițiile prezentate în exemplul 1. Soluția rezultată după filtrarea tangențială cu masă moleculară sub 3000 Da se concentrează la 17% prin centrifugare la vid și se usucă prin pulverizare. După uscare se obține o pulbere de peptide cu greutate moleculară mai mică de 3000 Da cu un conținut de 87% proteină, 1,5% lipide și 1,5 % cenușă.

Exemplul 3

Procedeul de obținere al peptidelor din pește este similar cu cel descris în exemplul 1 cu deosebirea că materia primă a fost un amestec de piele, oase și carne de pește și că tratamentul enzimatic se face cu ambele enzime, succesiv, astfel:

- în prima etapă se realizează hidroliza enzimatică cu 0,005 g Flavourzime®, dizolvată în prealabil în 150 ml tampon fosfat 0,2 M, pH 7,0, la temperatura de 50 °C, timp de 5 ore, urmată de inactivarea enzimei prin încălzirea soluției la 100°C, timp de 15 min;

- soluția rezultată se răcește, se aduce la pH 8,0 cu hidroxid de sodiu 10 M și se hidrolizează enzimatic cu o soluție de 0,007 g Alcalase®, dizolvată în tampon fosfat 0,2 M, pH 8,0. Reacția de hidroliză se realizează la temperatura de 60°C timp de 6 ore. După stoparea reacției enzimatice, se aduce pH-ul la 7,0 cu acid fosforic 10 M,



se decolorează soluția și se filtrează conform exemplului 1. Soluția recuperată după ultrafiltrare se concentrează la 12% și se usucă sub formă de pulbere, cu ajutorul unui atomizor. Hidrolizatul proteic obținut are o greutate moleculară mai mică de 3000 Da, un conținut în proteină de 90 %, în lipide de 1,5% și în cenușă de 1,5 %.

Probele de hidrolizate proteice, obținute în conformitate cu exemplele de mai sus, au fost analizate fizico-chimic și biologic. Rezultatele analizelor fizico-chimice și biochimice au demonstrat că probele de peptide analizate au prezentat un conținut ridicat în proteină (peste 85%) și scăzut în lipide (sub 2%) și în cenușă (sub 1,5%).

Exemplul 4

Se lucrează ca în exemplu 3, numai că se folosesc subproduse de novac, *Arystichtys nobilis*.

Exemplul 5.

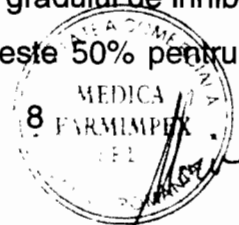
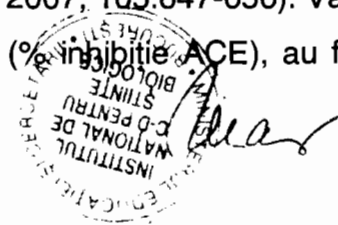
Se lucrează ca în exemplu 3, numai că se folosesc subproduse de cteno, *Ctenopharingodon idella*.

Exemplul 6.

Se lucrează ca în exemplu 3, numai că se folosesc subproduse de sânger / fitofag, *Hypophthalmichthys molitrix*.

Evaluarea activității antioxidante a hidrolizatelor proteice preparate prin hidroliză enzimatică controlată, s-a realizat prin metoda DPPH (W Wang și colab., *Czech J Food*, 2013, 31/1:1-4) care constă în determinarea cantitativă a capacității de inhibare/ neutralizare a radicalilor liberi DPPH (1,1- difenil-2- picril hidrazil), folosind ca standard o probă de Trolox, substanță cu activitate antioxidantă cunoscută. Rezultatele exprimate ca procente de inhibiție a radicalilor DPPH au demonstrat că toate hidrolizatele obținute conform exemplurilor de mai sus au prezentat activitate antioxidantă. Efectul de inhibare a radicalilor DPPH al probelor la concentrația de 10 mg/ml, exprimat procentual, a variat între 50% și 62%; valoarea cea mai mare (61,5%) a prezentat-o proba de hidrolizat proteic preparată prin tratamentul succesiv cu cele două enzime, flavourzimă și alcalază.

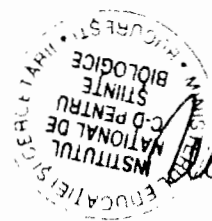
Activitatea antihipertensivă a variantelor de hidrolizate proteice obținute s-a evaluat prin determinarea potențialului de inhibare a enzimei de conversie a angiotensinei (ACE), conform metodei descrise de Papadimitriu și colab. (*Food Chemistry*, 2007, 105:647-656). Valorile gradului de inhibare a enzimei ACE exprimat procentual (% inhibiție ACE), au fost peste 50% pentru toate tipurile de hidrolizate



Robh

proteice. Cea mai mare activitate antihipertensivă, respectiv 78,5% l-a prezentat varianta de hidrolizat proteic obținută prin hidroliza cu alcalază.

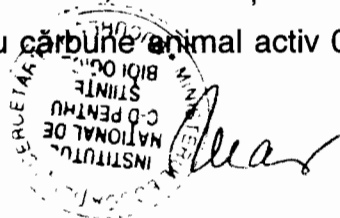
Testarea efectului antiproliferativ al hidrolizator proteice obținute din subproduse de pește, conform exemplilor prezentate, s-a realizat pe o linie stabilizată de celule tumorale Hep 2 provenită din carcinom epitelial uman, în conformitate cu standardul internațional ISO/EN 10993-5/2009. În acest context s-au investigat viabilitatea și proliferarea celulară prin metoda cantitativă MTT (reducerea bromurii de tetrazoliu la formazan insolubil în celule viabile) în prezența variantelor de probe, timp de 48 de ore de cultivare. Rezultatele obținute au arătat că toate hidrolizatele prezintă o activitate antiproliferativă semnificativă, la concentrații mai mari de 8 mg/ml. Datele noastre au evidențiat că variantele de hidrolizat testate la această concentrație au indus o inhibare a creșterii celulelor tumorale Hep2 de 38,6%, în cazul variantei obținută cu flavorzimă, de 42,5 % în cazul variantei extrasă cu alcalază și de 61,7% pentru varianta combinată cu cele două enzime.



REVENDICĂRI

1. Hidrolizat proteic conform invenției, **caracterizat prin aceea că** are un gust amar redus, un conținut în peptide cu masa moleculară medie mai mică de 3000 Da de peste 85% și următoarele proprietăți bioactive: activitatea antioxidantă de neutralizare a radicalilor liberi 1,1- difenil-2- picril-hidrazil (DPPH) de cel puțin 60%, antihipertensivă, de inhibare a enzimei de conversie a angiotensinei de cel puțin 50% și activitate antitumorală, de inhibare a creșterii celulelor de tip Hep 2 de cel puțin 60%.

2. Procedul de obținere a hidrolizatului proteic de pește, conform invenției, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: spălarea intensă a unei cantități de 100...1000 g subproduse de pește, cu apă de robinet, în flux continuu, timp de 1...3 ore, apoi cu apă distilată, timp de 30...50 min; mărunțirea mecanică a țesutului spălat cu ajutorul unei mașini electrice de tocat carne cu sită de 3 mm, urmată de decalcifierea țesutului mărunțit prin tratare cu o soluție de acid clorhidric 0,2...1,5 M, timp de 4...24 ore, în raport de greutate țesut umed : soluție de decalcifiere de 1:10...1:40, la temperatura camerei, cu agitare ușoară continuă; separarea prin filtrare a țesutul decalcifiat, urmată de spălare intensă cu apă timp de 1...3 ore, scurgerea excesului de apă și delipidizare prin tratare cu 4...10 volume de amestec acetonă/ apă distilată 1:1, timp de 4...20 h, la temp. camerei, sau cu 1...4 volume izopropanol, la temp. de 30...70°C, timp de 1...10 ore, cu agitare; spălarea cu apă în flux continuu a țesutului delipidizat, pentru eliminarea urmelor de grăsime, amestecarea cu apă distilată rece, în raport 1:2...1:5 (g/vol), omogenizare 2...5 min la 500...2000 rpm și tratarea cu 3...5 volume soluție hidroxid de sodiu 0,1 M, timp de 1...4 ore, cu agitare la rece; separarea sedimentului de țesut din omogenat prin centrifugare la 2000...5000 rpm, timp de 20...40 min și înlăturarea supernatantului; spălarea intensă a țesutului obținut după tratamentul alcalin, urmată de hidroliză enzimatică prin tratare cu proteaze microbiene, dizolvate în prealabil în 6...10 volume tampon fosfat 0,2M, pH 7,0...8,5, în raport de greutate enzimă: substrat de 1:20...1:60, la 50...70°C, timp de 1...8 ore; inactivarea enzimelor prin încălzirea extractului la 90...100°C, timp de 10...30 min, urmată de răcire și separarea țesutului ne-extras prin centrifugare la 3000...5000 rpm, timp de 30...50 min, ajustarea pH-ului la valoarea 7,0 cu soluții concentrate de hidroxid de sodiu sau acid clorhidric și tratarea cu **cărbune animal activ** 0,5...2,0%, prin amestecare și agitare timp



de 2...15 ore, la temperatura camerei; decantarea cărbunelui activ, urmată de ultrafiltrarea tangențială, prin folosirea unei membrane filtrante cu fibre de polisulfonă, cu limita de excludere a maselor moleculare de 3000 Da; concentrarea soluției rezultată după filtrare la 10...20 % substanță uscată și uscarea prin pulverizare, la 130-145 °C temperatură de intrare și 80°C temperatură de ieșire.

3. Procedul de obținere a hidrolizatului proteic de pește, conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** subprodusele de pește pot fi resturi de piele, oase, carne și viscere, separate sau în amestec inițial, și provin de preferință de la ciprinidele de crescătorie, crap *Cyprinus carpio*, novac, *Arystichtys nobilis*, cteno, *Ctenopharingodon idella*, sânger / fitofag, *Hypophthalmichthys molitrix*.

4. Procedul de obținere a hidrolizatului proteic de pește, conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** enzimele folosite sunt un amestec de aminopeptidaze, dipeptilpeptidaze și endo-peptidaze produs de *Aspergillus oryzae*, și/sau subtilizina A, o serin endo-peptidază produsă de *Bacillus licheniformis*.

