



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2021 00083**

(22) Data de depozit: **02/03/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/09/2022 BOPI nr. **9/2022**

(71) Solicitant:
• **IVĂNESCU MARINELA**,
STR. STEAUA ROȘIE NR.31F, BL.F, AP.4,
OTOPENI, IF, RO

(72) Inventatori:
• **IVĂNESCU MARINELA**,
STR. STEAUA ROȘIE NR.31F, BL.F, AP.4,
OTOPENI, IF, RO

(54) **METODĂ DE OBTINERE ȘI CARACTERIZARE A PULBERII
ORODISPERSABILE CU LIZOZIM ȘI IMUNOGLOBULINE Y
CU FUNCȚIE NUTRITIVĂ, PROBIOTICĂ, ANTIMICROBIANĂ
ȘI IMUNOMODULATOARE ACRONIM: YLOP**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs alimentar cu funcție nutritivă, probiotică, antimicrobiană și imunomodulatoare și caracterizarea acestuia. Procedeu, conform invenției, constă în aceea că un mix lichid realizat din oul integral, combinații ale diferitelor componente ale oului, ingrediente imunologic active din ou de tip imunoglobuline, lizozim, ovotransferine, macroglobuline, opțional, alte ingrediente cu indicații pentru sănătate, se omogenizează cu diferiți excipienți, amestecul rezultat este supus simultan acțiunii a minimum două procese de anabioză, realizată prin deshidratare la temperaturi de maximum 75°C și

osmoanabioza realizată prin adaosul de excipienți, completate de anoxianabioza în atmosferă de gaz inert ca agent bioinhibitor, din care rezultă un produs concentrat, conservat și stabilizat de tip pulbere granulată, orodispersabilă, cu solubilitate și palatabilitate superioare, care asigură bioactivitatea pentru multiple ingrediente naturale din ou sau adăugate, cum sunt IgY, lizozim, vitamine, enzime, minerale etc.

Revendicări: 11
Figuri: 2



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI Cerere de brevet de invenție Nr. a 2021 0083 Data depozit 02-03-2021
--

TITLUL BREVETULUI DE INVENȚIE:

**METODĂ DE OBTINERE ȘI CARACTERIZARE A PULBERII ORODISPERSABILE CU
LIZOZIM ȘI IMUNOGLOBULINE Y CU FUNCȚIE NUTRITIVĂ, PROBIOTICĂ,
ANTIMICROBIANĂ ȘI IMUNOMODULATOARE**

ACRONIM: Y.L.O.P.

AUTOR: Marinela Ivănescu

DOMENIUL DE APLICARE:

Industria nutraceutică, supliment alimentar, biotehnologie, anabioză, excipienți , orodispersabilitate, probiotic, antimicrobian, imunomodulator

PREZENTAREA STADIULUI TEHNIC

Datorită compoziției lor chimice, produsele alimentare reprezintă medii de nutriție prielnice pentru dezvoltarea microorganismelor, fiind o sursă excelentă pentru procurarea energiei și desfășurarea activităților metabolice.

Atât în procesul de fabricare, cât și în cele de păstrare și comercializare a alimentelor substanțele nutritive sunt supuse acțiunii factorilor biologici, fizici, chimici. Numeroase materii prime și produse alimentare se alterează ușor, scurtând considerabil durata lor de păstrare(38, 42).

Conservarea asigură creșterea stabilității produselor alimentare și prelungirea duratei de păstrare a alimentelor . În acest sens, se recurge la utilizarea unor procedee de stabilizare a proprietăților alimentelor(44).

Utilizarea unuia sau altuia dintre procedeele de conservare a alimentelor implică diverse operații tehnologice suplimentare, în urma cărora produsele suferă modificări fizice, chimice și chiar biochimice. De obicei, în urma procesării valoarea gustativă și nutritivă se ameliorează.

Scopul final al conservării printr-un anumit procedeu, sau prin aplicarea conjugată a procedeelelor de conservare este de a inhiba modificările fizico-chimice din interiorul produselor și de a stopa/încetini multiplicarea microorganismelor care habitează produsele, astfel încât stabilitatea la păstrare a produselor alimentare să fie cât mai mare.

Procedeele de conservare au la baza următoarele principii biologice: bioza, anabioza, cenoanabioza și abioza.

Conservarea produsului prin protecție față de o serie de factorii externi, trebuie să se realizeze atât în timpul procesării cât și în timpul depozitării și anume :

-factorii fizici - umiditatea relativă a aerului, particulele de praf din atmosferă, corpuri străine, lumina, temperatura etc.

- factorii chimici și fizico-chimici - aer, apă, oxigen, CO₂etc.

- factorii biologici - microorganisme, insecte etc.

Din punct de vedere fizic, ambalajul trebuie să protejeze produsul și să acționeze ca o barieră, stopând sau diminuând la limite normale pătrunderea luminii, a temperaturii sau a altor agenți fizici care ar putea conduce la deteriorarea însușirilor calitative ale produselor(40, 44).

Din punct de vedere chimic și fizico-chimic este foarte important ca produsul să nu intre în contact cu substanțe chimice agresive cum sunt H₂, NH₃, SO₂, CO₂, prin intermediul vaporilor, gazelor produse de substanțele volatile (hidrocarburi, fum, parfumuri etc).

În acest caz, rolul de barieră vizează și transferul gazos din interior către exterior, pentru a evita pierderea aromelor specifice produsului, deshidratarea acestuia, pierderea gazelor introduse în ambalaj în scopul conservării produselor etc.

Protecția biologică vizează menținerea calității igienice și microbiologice a produselor alimentare. În acest scop, ambalajele trebuie să împiedice atât pătrunderea microorganismelor existente în atmosferă sau care pot fi preluate la contactul cu anumite suprafețe, persoane etc., cât și crearea condițiilor favorabile apariției și dezvoltării germenilor patogeni(43).

Ambalarea în atmosferă modificată și ambalarea în vid se practică în special la produsele sensibile la acțiunea oxigenului (ex: carnea și preparatele din carne, produsele bogate în **grăsimi**), care ar putea fi degradate chiar de cantități foarte mici de oxigen (ramase în ambalaj) pe parcursul unei păstrări mai îndelungate. Cele două metode au același scop (eliminarea oxigenului), alegerea uneia sau alteia fiind condiționată de către caracteristicile produsului ce urmează a fi ambalat(39).

– Ambalarea în atmosferă modificată constă în extragerea oxigenului din interiorul ambalajului și introducerea în locul lui a unor gaze inerte cum sunt azotul și dioxidul de carbon.

Azotul (N₂) este inert, inodor și puțin solubil în apă și grăsimi; scopul folosirii sale este reducerea oxidării grăsimilor.

– Ambalarea în vid constă în reducerea presiunii aerului din interiorul ambalajului cu ajutorul unei instalații speciale. Este indicată pentru produsele sensibile la frecare, asigurând păstrarea integrității acestora și contraindicată produselor sensibile la presiune, care pot fi deteriorate sau distruse.

Gazele inerte sunt utilizate în general pentru a evita reacțiile chimice nedorite care degradează un produs. Aceste reacții chimice nedorite sunt adesea reacții de oxidare și hidroliză, favorizate de oxigenul și umiditatea din aer (41).

Datorită proprietăților nereactive ale gazelor inerte, acestea sunt adesea utilizate pentru a preveni reacțiile chimice nedorite. Alimentele sunt ambalate în gaz inert pentru a elimina oxigenul. Acest lucru împiedică dezvoltarea bacteriilor și previne oxidarea chimică a substanțelor susceptibile, de exemplu grăsimile. În ambalarea alimentelor, gazele inerte sunt utilizate ca conservant pasiv, spre deosebire de conservanții activi precum benzoatul de sodiu (un antimicrobian) sau BHT (un antioxidant).

Oxidarea grăsimilor are loc în intervalul 20 – 140°C și conduce la formarea de aldehide, cetone, **acizi grași liberi sau oxidați**, trigliceride dimerizate prin punți de oxigen etc. Oxidarea este accelerată, pe lângă temperatură, de suprafața de contact cu aerul.

Procesarea prin deshidratare a mixurilor bogate în grăsimi în prezența oxigenului atmosferic poate duce la oxidarea acestora/râncezire și la degradarea produsului finit obținut.

Oxidarea poate fi stopată prin procesarea în atmosfera de gaze inerte(azot, argon etc) și astfel oxigenul necesar reacției de oxidare este înlocuit de agenți bioinhibanți, printr-un proces de anoxianabioză.

Ouăle de pasăre sunt recunoscute de multă vreme ca o excelentă sursă de nutrienți și factori biologici cu acțiuni imunomodulatoare, antibacteriană, antivirală, antimicotică (**imunoglobuline**, ovotransferine, **lizozim**, ovomucina, ovomacroglobulina s.a.) (12, 15, 22).

În ce privește compoziția chimică a oului acesta este un aliment complet, conținând proteine, grăsimi, substanțe **minerale, vitamine, enzime** s.a.. Proteinele oului au o valoare nutritivă foarte mare, considerându-se că au cel mai echilibrat conținut de aminoacizi, iar grăsimile conțin acizi grași esențiali valoroși(5, 27, 30, 31).

Componentele imunologic și biologic active din ou pot ajunge prin **tehnici adecvate** în produse care asigură le biodisponibilitatea și pot fi administrate omului și animalelor cu rol de suport imunitar, nutritiv, cu multiple indicații de sănătate.

Factorii biologici cu acțiuni imunomodulatoare, antibacteriană, antivirală, antimicotică (imunoglobuline, ovotransferine, lizozim, ovomucina, ovomacroglobulina s.a.) din pulberea orodispersabilă cu imunoglobuline Y și lizozim acționează probiotic la nivelul tubului digestiv , reglând flora bacteriană și în acest mod susține o bună funcție imună(6-9).

- **Imunoglobulinele Y (IgY)** – sunt anticorpi aviani secretați în mod natural în ou, majoritari din punct de vedere cantitativ și cu funcții similare imunoglobulinelor G de la mamifere, prezente în colostru. Imunoglobulinele Y intervin în răspunsul imun secundar cu rol în neutralizarea toxinelor, virusurilor, bacteriilor, opsonizarea bacteriilor și intensificarea fagocitozei, citotoxicitate mediată celular anticorp-dependentă (celulele acoperite de anticorpi sunt distruse de celulele K)(12, 13, 23, 32).

În urma cercetărilor genetice, IgY aviare au fost catalogate ca fiind precursorii evolutivi ai imunoglobulinelor mamifere IgG și IgE.

Prin consumarea oului în mod obișnuit factorii biologici de interes din compoziția acestuia sunt distruși de tratamentul termic aplicat . Imunoglobulinele Y din ou sunt termolabile fiind distruse de temperaturi mari . Vitaminele și enzimele sunt de asemenea termolabile(12, 25).

Lizozimul este o enzimă prezentă în mod natural în plante și animale care are un rol important în mecanismul natural de apărare. Are capacitatea de a leza pereții celulari ai bacteriilor Gram-pozitive prin hidroliza peptidoglicanilor(14, 36). Poate omorî și bacteriile Gram-negative dacă acestea au membrana exterioară deteriorată înainte de expunere. Eficiența terapeutică a lizozimului prezent în ou se bazează de fapt pe capacitatea sa de a controla creșterea bacteriilor sensibile și de a modula imunitatea gazdei împotriva infecțiilor și a scăderii răspunsurilor imune(24, 33-35). Dacă prima

caracteristică se bazează pe dovada activității biologice a acestei enzime, a doua este o achiziție relativ recentă de o importanță extremă pentru posibilitățile oferite în ceea ce privește reglarea funcționării sistemului imunitar al gazdei (28, 29). Activitatea antibiotică și efectele de stimulare a imunității sunt utilizate, de asemenea, împreună, ca și în cazul tratamentului infecțiilor gastro-intestinale, inclusiv a celor provocate prin tratamente terapeutice(14, 24). Pe baza acestor proprietăți biologice, pe lângă gama largă de activități terapeutice pentru care lizozimul a fost exploatat în trecut, în prezent cele mai promițătoare date se referă la prevenirea cariogenezei bacteriene și a tratamentului pacienților cu cancer pentru a îmbunătăți eficacitatea medicamentelor anticanceroase sau a permite gazdei să se recupereze din imunodepresia cauzată de tratamentele anticanceroase(26, 37).

Este cunoscut faptul că 70-80% din sistemul imun este localizat în tubul digestiv (GALT – Gut Associated Lymphoid Tissue). Organismul dezvoltă populații bacteriene benefice la nivelul intestinului cunoscute sub numele de **probiotice**, cu funcții în digestia alimentelor, absorbția nutrienților, conversia în energie și eliberarea de hormoni.

Dar odată cu ingestia de alimente aducem în tractul gastrointestinal **microorganisme** și substanțe **toxice**, care perturbă flora digestivă normală, intră în competiție cu aceasta și apar dezechilibre în funcționarea digestiei, implicit în funcționarea formațiunilor limfoide asociate, cu efect **dezechilibrarea** răspunsului imun.

Factorii biologici activi din pulberile **YLOP** acționează asupra acestor invadatori perturbatori ai florei digestive, prin diferite mecanisme de distrugere și/sau neutralizare și transmite semnale sistemului imun care la rândul lui trimite în luptă toate elementele de care dispune pentru **echilibrarea** statusului imunitar(13, 23).

În acest mod flora bacteriană benefică, probiotică se dezvoltă și funcționează la potențialul optim și astfel se asigură o funcție imună normală. O funcție digestivă normală duce la un răspuns imun normal.

Formele medicamentoase cu dezagregare și dizolvare rapidă, **orodispersabile**, constituie o formă modernă de administrare a substanțelor medicamentoase, relativ recent introdusă în terapeutică, fiind o alternativă la preparatele orale convenționale (soluții, suspensii, comprimate sau capsule).

Aceste forme medicamentoase au ca trăsătură distinctivă capacitatea de a se dispersa și dizolva rapid în salivă odată plasate în cavitatea orală, înainte de a fi înghițite. Dispersarea, dezagregarea sau dizolvarea acestora are loc în câteva minute, fără a fi mestecate și fără a necesita apă pentru administrare.

În prezent, interesul pentru aceste forme moderne de administrare este în creștere, în principal datorită avantajelor pe care le prezintă în comparație cu alte forme medicamentoase cunoscute, chiar și în

comparație cu comprimatele obișnuite. Formulele cu dizolvare/dezagregare rapidă sunt foarte adecvate pentru administrarea la pacienți care au dificultăți de deglutiție (disfagie), în special din categoria vârstnicilor și copiilor(16, 17).

- Reprezintă o formă farmaceutică ideală pentru substanțe medicamentoase care se absorb la nivel bucal. Pot constitui forme adecvate pentru eliberarea orală a unor proteine sau peptide terapeutice, care au o biodisponibilitate limitată când sunt administrate în comprimate convenționale, cum este cazul IgY(7-9).
- Maschează gustul neplăcut al unor substanțe medicamentoase, îmbunătățind complianța, în special în cazul copiilor(20, 21). Maschează gustul brut de ou, în cazul produselor formulate în acest brevet.
- Comparativ cu preparatele lichide orale, ele sunt mult mai ușor de transportat și permit realizarea unei dozări exacte la administrare(18,19).

Excipienții utilizați în formulare sunt strâns legați de tehnologia de fabricație și de caracteristicile ce trebuie conferite acestor pulberi.

O categorie importantă de excipienți este reprezentată de dezagreganți sau superdezagreganți. Aceștia joacă un rol important în dizolvarea și dezagregarea formelor orodispersabile, deoarece un dezagregant adecvat și o concentrație optimă a acestuia asigură dezagregarea rapidă și viteze înalte de dizolvare.

O altă categorie de excipienți este reprezentată de carbohidrați - glucide, utilizate pentru mascarea gustului și ca excipienți de umplură. Dintre carbohidrați, se folosesc mai ales manitolul, sorbitolul, xilitolul, dextroza, fructoza etc., care sunt solubile conferind o senzație plăcută în gură și o bună mascare a gustului. De asemenea, carbohidrații dau cristalinitate, textură și eleganță preparatelor. În plus numeroase studii demonstrează acțiunea conservantă a diversilor carbohidrați asupra imunoglobulinelor mamifere și aviare (1 - 4).

În prezent, formulele orodispersabile se obțin prin aplicarea câtorva tehnologii de fabricație și constau în: liofilizare (uscarea prin congelare sau criodesicare), sublimare, uscarea prin pulverizare, turnare (prin comprimare sau încălzire), extrudarea masei și comprimare directă.

Liofilizarea este un proces care a fost utilizat inițial pentru uscarea substanțelor termolabile, s-a remarcat și ca metodă de preparare a unor noi forme farmaceutice. Porozitatea mare, cea mai importantă caracteristică a produselor liofilizate, a dus la utilizarea produselor ca forme farmaceutice cu dezagregare rapidă. În ultimii ani, multe dintre studiile pe tema liofilizării s-au concentrat pe

identificarea și testarea de excipienți noi, care să poată conferi o rezistență mecanică suficientă, o viteză de uscare mai mare, stabilitate crescută în timp și dizolvare rapidă a principiului activ (10,11).

La dezvoltarea unui sistem cu dizolvare/dezagregare rapidă se au în vedere și alte obiective cum ar fi necesitatea de a masca gustul substanței medicamentoase și încorporarea substanței active în matrița produsului .

Formularea pe scurt a soluțiilor tehnice

Obiectivul prezentei invenții este metoda de obținere și caracterizare pulberii **orodispersabile cu imunoglobuline Y și lizozim cu funcție nutritivă, probiotică, antimicrobiană și imunomodulatoare** prin aplicarea a minimum două procedee combinate simultan de anabioză(deshidratare, osmoanabioză, anoxianabioză, crioanabioză etc) și adaos de excipienți, cu palatabilitate superioară – orodispersabilitate , cu destinație de suport nutritiv, imunitar și cu funcție probiotică, antimicrobiană și imunomodulatoare.

Deshidratarea parțială este un procedeu de uscare bazat pe reducerea conținutului de apă, respectiv creșterea concentrației substanțelor uscate, până la valori care să permită stabilitatea produselor alimentare la păstrare. Prin reducerea umidității produselor se încetinește, până la stagnare activitatea enzimatică și se oprește dezvoltarea microorganismelor. Procesarea în absența oxigenului aduce stabilitate microbiologică, fizică și chimică pulberii obținute. Ambalarea în atmosferă controlată/vid și în folie multistrat cu rol de barieră protejează și menține produsul obținut pentru perioade lungi de timp.

Excipienții folosiți sunt substanțe diverse, opțional naturale(glucide/carbohidrați/zaharuri/sarea/fibre/fructo-oligozaharide etc.) sunt cunoscute ca cei mai eficienți și siguri conservanți . Principalul avantaj al conservanților naturali este că, spre deosebire de cei artificiali bine cunoscutele E-uri, nu provoacă probleme de sănătate.

Pentru stabilirea metodei de obținere a pulberii orodispersabile **YLOP** a fost realizat un program de cercetare care a urmărit obținerea unui produs alimentar / supliment alimentar original, orodispersabil, concentrat, conservat prelucrat în **condiții de temperatură și atmosferă controlate**, cu adaos de excipienți și ambalare în pungi multistrat, opțional în vid sau gaz inert. Produsul poate fi păstrat la temperatura camerei perioade lungi de timp , fiind stabil organoleptic, microbiologic și fizico-chimic. **Pulberile astfel obținute concentrează și conservă elementele nutritive , biologic și imunologic active conținute de oul crud, produsele putând fi folosite ca supliment alimentar, cu funcție nutritivă, probiotică , antimicrobiană și imunomodulatoare.**

Avantajele esențiale ale produsului obținut constau în :

Conținutul redus de apă și prelucrarea/ambalarea în atmosferă de gaz inert asigură stabilitatea produselor. Crește conservabilitatea produselor acestea putând fi păstrate la temperaturi sub 25°C, menținându-și caracterele organoleptice, fizico-chimice și microbiologice.

Produsele sunt obținute din ingrediente naturale concentrate prin deshidratare/uscarea la temperaturi moderate care păstrează bioactive principiile de interes(imunoglobuline, vitamine, lizozim etc) , la care se adaugă excipienți astfel încât conservă și totodată păstrează proprietățile biologice și nutraceutice ale ingredientelor active, fiind produse valoroase pentru sănătate.

Creșterea palatabilității prin adaosul de excipienți și arome.

Prin adaosul de excipienți s-a îmbunătățit solubilitatea ceea imprimă caracteristici orodispersabile pulberilor , aspect cu atât mai important întrucât IgY se absoarbe și la nivelul cavității bucale. De asemenea, se reduce caracterul higroscopic al pulberilor, acestea nu mai absorb vaporii de apă din mediu.

Se pot încorpora diverse principii active de diferite origini(vegetală, mineral, animală etc) și pulberea poate fi folosită la fabricarea altor forme de prezentare(comprimate, dropsuri etc) și duce la obținerea de produse cu multiple indicații pentru sănătate.

Metoda de obținere constă în deshidratarea la temperaturi moderate, în atmosferă controlată a unui mix lichid realizat din ouă și/sau ingrediente active cu indicații pentru sănătate, excipienți, arome prin liofilizare sau alte metode de uscare.

Pentru caracterizarea Y.L.O.P. s-au folosit tehnici de laborator și testări clinice privind :

- Conținutul de lizozim prin tehnica de imunodifuzie în gel de agar
- Testare senzorială și teste “*in vivo*” a caracteristicilor ce imprimă orodispersabilitatea produselor
- Evaluare clinică privind funcția probiotică și reacția digestivă în urma administrării pulberii
- Evaluare paraclinică privind creșterea rezistenței nespecifice – prin monitorizarea unor efectori celulari – leucocite
- Conținutul de grăsimi și gradul de degradare – oxidare a acestora

Y.L.O.P. aduce un aport de substanțe nutritive valoroase, complete, ușor asimilabile, naturale, într-o formă concentrată, proteine și grăsimi, cu elemente structurale esențiale, aminoacizi și acizi grași, imunoglobuline, vitamine, minerale, enzime etc..

Produsul are o valoare energetică ridicată și poate fi consumat de toate categoriile de vârstă, singurele contraindicații și restricții privind consumul fiind legate de alergiile la oricare ingredient.

Pulberea orodispersabilă cu imunoglobuline Y și lizozim – YLOP - cu funcție nutritivă, probiotică, antimicrobiană și imunomodulatoare poate conține:

- factorii biologici cu acțiune imunomodulatoare, antibacteriană, antivirală, antimicrobică (imunoglobulină, ovotransferine, lizozim, ovomucina, ovomacroglobulina s.a.)
- substanțe cu valoare nutritivă și biologică recunoscute (proteine, grăsimi, carbohidrați, factori de creștere, aminoacizi și acizi grași esențiali, vitamine, minerale, enzime etc.).
- ingrediente cu recomandări pentru sănătate de diverse origini (vegetală, mineral, animală etc)

Metoda de obținere a pulberii **orodispersabile cu imunoglobuline Y și lizozim cu funcție nutritivă, probiotică, antimicrobiană și imunomodulatoare** constă în folosirea tehnicilor de deshidratare la temperaturi moderate care protejează/mențin stucturile termolabile de interes nealterate(imunoglobuline, lizozim, vitamin, enzime etc) în prezența unor substanțe suport - excipienți și atmosferă controlată, procese care conservă și stabilizează produsul, protejează componentele bioactive și asigură biodisponibilitatea acestora .

Prezenta invenție se referă la producerea și caracterizarea pulberii **orodispersabile cu imunoglobuline Y și lizozim cu funcție nutritivă, probiotică, antimicrobiană și imunomodulatoare**, pentru orice combinație realizată din ouă integrale, din componentele oului sau a elementelor izolate din oul integral, opțional ingrediente cu recomandări pentru sănătate, excipienți și arome, în condiții de temperatură și atmosferă controlate.

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Metoda, conform invenției constă în prelucrarea sub formă pulberii **orodispersabile cu imunoglobuline Y și lizozim cu funcție nutritivă, probiotică, antimicrobiană și imunomodulatoare** a ouălelor și opțional cu ingrediente cu recomandări pentru sănătate, prin deshidratare/uscare la temperaturi de maximum 75 ° C în atmosferă de N₂, în prezența unor excipienți și arome.

Pulberea orodispersabilă cu imunoglobuline Y și lizozim cu funcție nutritivă, probiotică, antimicrobiană și imunomodulatoare poate fi obținută din:

- ou integral , ou integral și adaos de componente nutritive / biologic active izolate din oul integral, din albuș, din galbenuș, din membrane, din coajă s.a.
- orice altă combinație a componentelor oului sau a elementelor izolate din oul integral.

La care se adaugă:

-opțional ingrediente cu recomandări pentru sănătate((de origine vegetală, minerală, animală)

-excipienți (amidon, sare, sucroză, dulce de stevie, miere, melasă, sirop de agave, sirop de arțar, maltodextrina, manitol, amidon, dextran, lactoză, fibre, FOS etc.) , alte substanțe suport.

- aromatizanți(vanilie, cacao, căpșuni, banane etc.).

Oul crud sau componente ale acestuia se omogenizează cu un mix obținut din excipienți, ingrediente cu recomandări pentru sănătate și aromă se supune unui proces de deshidratare(liofilizare, atomizare, uscare în pat fluidizat etc) în atmosferă de gaz inert – N₂. Amestecul astfel obținut este supus **simultan** acțiunii a **minimum** două procese de anabioză care conduc la obținerea pulberii orodispersabile.

Primul este xeroanabioza prin deshidratarea parțială, prin folosirea căldurii și/sau a criodisecării. Cel de-al doilea, osmoanabioza prin adaos de excipienți și anoxianabioza - atmosfera de gaz inert N₂ agent bioinhibitor .

Metoda de obținere aplicată duce la :

- reducerea contactului cu oxigenul în timpul procesului de uscare și eliminarea riscului de multiplicare a microorganismelor și de oxidare a grăsimilor din produs
- obținerea unei pulberi cu caracteristici orodispersabile, cu solubilitate și palatabilitate superioare unei pulberi realizate numai din ou, cu caracter higroscopic redus
- obținerea unei pulberi conservate prin deshidratare, adaos de excipienți, procesare și ambalare în atmosferă controlată
- păstrarea, conservarea și concentrarea componentelor nutritive și bioactive, și asigurarea biodisponibilității acestor(grăsimi, proteine, enzime, IgY, lizozim, vitamine, minerale etc.)
- integrarea/încorporarea altor principii active în afara celor din ou, ingrediente cu recomandări pentru sănătate

Produsul astfel obținut, se ambalează în recipiente din material cu rol de barieră de protecție pentru lumină, vapori de apă și gaze, pentru a împiedica rehidratarea pulberii. Opțional se poate ambala în vid sau gaz inert. Fluxul tehnologic este redat în **Figura 2**.

Adaosul de excipienți și arome îmbunătățește palabilitatea produsului, estompând gustul brut de ou. De asemenea, îmbunătățește solubilitatea pulberii obținute, astfel încât îi imprimă proprietăți orodispersabile. În procesul de deshidratare, excipienții solubilizați în mix, recristalizează imprimând produsului rezultat o textură poroasă dar dură în același timp, care permite realizarea unei pulberi granulate prin sitarea și/sau măcinarea liofilizatului. Atmosfera controlată reduce acțiunea oxigenului asupra microorganismelor și grăsimilor din produs, stopând creșterea microorganismelor și oxidarea/râncezirea produselor, ceea ce conferă stabilitate microbiologică și fizico-chimică pulberii obținute. **Y.L.O.P.** furnizează organismului nutrienți esențiali, factori biologici, ingrediente active și componente imunologice, într-o formulă concentrată, conservată și stabilizată.

METODĂ DE OBȚINERE A PULBERII ORODISPERSABILE CU LIZOZIM ȘI IMUNOGLOBULINE Y CU FUNCȚIE NUTRITIVĂ, PROBIOTICĂ, ANTIMICROBIANĂ ȘI IMUNOMODULATOARE

Pulberea orodispersabilă cu imunoglobuline Y și lizozim cu funcție nutritivă, probiotică, antimicrobiană și imunomodulatoare se obține din ou integral, sau din combinații ale diferitelor componente ale oului sau din ingrediente imunologic active din ou/opțional și alte ingrediente cu indicații pentru sănătate, în diferite proporții, care să asigure un conținut minim de ingredient activ: imunoglobuline, vitamine, minerale, factori de creștere, factori de transfer, enzime, lizozim, colagen fibre etc. .

Oul și ingredientele cu indicații pentru sănătate, se omogenizează cu un mix de excipienți în proporția necesară, astfel încât prin uscare conținutul și activitatea apei să fie reduse sub limita care asigură stabilitatea microbiologică a produsului.

Amestecul este supus uscării la temperaturi optime în atmosferă de N₂, până la un conținut de apă de maxim care asigură conservabilitatea pulberii, prin metode care păstrează structura și activitatea biologică a componentelor de interes din oul crud și a celor adăugate pentru mențiuni de sănătate (IgY, lizozim, ovotransferine, vitamine, minerale, enzime etc.). Pulberea se ambalează în pungi multistrat, opțional în gaz inert sau vid.

Y.L.O.P., astfel obținută este conservată și stabilizată, se poate depozita, transporta și comercializa ca și ingredient alimentar/supliment alimentar, cu funcție nutritivă, probiotică, antimicrobiană și imunomodulatoare.

MODELE RECOMANDATE DE OBȚINERE ȘI CARACTERIZARE A INVENȚIEI

Cele patru 5 modele prezentate în continuare au drept scop **ilustrarea și nu au intenția de a limita scopul** prezentei invenții.

Obținerea pulberii orodispersabile prin deshidratarea la temperaturi sub 75 °C în atmosferă de N₂ a omogenizatului din ou integral, cu adaos de excipienți și aromă Vanilie Bourbon.

1.Evaluarea “ in vivo” a formulelor obținute cu diverși carbohidrați

Formulele obținute prin liofilizare din ou integral în atmosferă de N₂, cu adaos de excipienți și vanilie au fost evaluate “ in vivo”. Evaluarea a constat în măsurarea timpului de dezagregare/solubilizare în cavitatea bucală a unei cantități de 3g de pulbere, aprecierea gustului, a volumului de reziduu și a palatabilității totale. (Tabel 1)

Tabel 1 - Evaluarea “ in vivo” a diverselor formule deshidratate

Nr.	Varianta testată	V1	V2	V3	V4	V5	V6
Crt.	Parametrul analizat/conținut de excipient	36%	46%	51%	30%	40%	50%
1.	Dispersabilitate –Se dispersează ușor în cavitatea bucală	x	x	x	x	x	x
2.	Solubilizare – max. 5 min.	x	x	x	x	x	x
3.	Gustul plăcut dulce aromat	x	x	x	x	x	x
4.	Reziduu-cantitate nesemnificativă/degluțiție facilă	x	x	x	x	x	x
5.	Palatabilitate totală -corespunzătoare	x	x	x	x	x	x

Proba M - martor – din ou integral liofilizat - Ramâne sub formă de aglomerare în cavitatea bucală, nu se dispersează și se solubilizează foarte greu. Mirosul, gustul, aroma neplăcute de pulbere de ou brut. Palatabilitate totală redusă datorată senzației de gust, miros și aromă dezagreabile, obținute din masticarea și degustarea pulberii martor obținută numai din ou .

Concluzii testare:

Variantele procesate cu excipienți se dispersează ușor și uniform în cavitatea bucală, proprietate imprimată de adaosul de excipienți, care realizează granulația produsului finit și dezagregarea acestuia, totodată imprimă și solubilizarea produsului . Aceasta proprietate nu se regăsește la formularea martor cu ou integral simplu, fără adaos de excipient. Solubilizarea se realizează diferit în funcție de concentrația în excipienți, între 3 – 5 minute, fiind mai rapidă în cazul formulelor mai concentrate în excipienți . Testele au fost reluate periodic la 6 luni până la 24 luni, rezultatele înregistrate fiind similare celor inițiale.

2.Testarea conținutului de lizozim

Pentru testarea conținutului de lizozim s-a folosit metoda difuzimetrică.

Principiul metodei: pe o placă în care se încorporează cultură de *Micrococcus lysodeicticus* tulpină ATCC se aplică probele de produs de analizat în godeuri practice în gel. Prin difuzia lizozimului din probe se formează în jurul godeului un halou(**Figura 1**)

Diametrul haloului este proporțional cu concentrația lizozimului care lizează germeii incluși în mediu. Calculul concentrației lizozimului s-a realizat, prin interpretarea valorilor pe curba etalon realizată cu ajutorul unor concentrații standard. Măsurile de asigurare a calității rezultatelor au fost folosirea standardului de lizozim și tulpina bacteriană certificată ATCC.

Pulbere 4 probe cu diferiți carbohidrați 12g pulbere la 100ml a.d. agitat/ dizolvat/sedimentat/centrifugat și am preluat două diluții (Tabel 2)

Tabel 2 - Rezultate testare lizozim prin metoda difuzimetrică

Nr.proba/dilutie	1ml/0,5ml la 100ml	2ml/1ml la 100ml	3ml/1,5 la 100ml
1	lizozim prezent	lizozim prezent	lizozim prezent
2	lizozim prezent	lizozim prezent	lizozim prezent
3	lizozim prezent	lizozim prezent	lizozim prezent
4	lizozim prezent	lizozim prezent	lizozim prezent

Concluzii testare:

La variantele testate de pulbere liofilizată a produsului finit, se observă că:

- lizozimul se regăsește în toate variantele testate
- excipienții și aromele folosite au păstrat activitatea lizozimului
- concentrațiile diferite ale excipienților nu au influențat activitatea lizozimului, aceasta regăsindu-se în toate formulele testate obținute prin liofilizare

Rezultatele obținute demonstrează că:

- tehnologia folosită conservă și păstrează bioactiv lizozimul din ou
- adaosul de excipienți și aromatizant nu afectează activitatea lizozimului
- lizozimul are efect antimicrobian asupra tulpinii de referință *Micrococcus lysodeicticus* tulpină

ATCC ceea ce demonstrează activitatea antimicrobiană a pulberii liofilizate

3.Rezultate clinice și paraclinice privind efectul probiotic, imunomodulator și reacția digestivă în urma administrării YLOP

3.1 A fost administrată pulbere orodispersabilă cu imunoglobuline Y și lizozim, **pacienților de vârstă a treia, cu vârste cuprinse între 67-92 ani**, cu multiple patologii, sub observație medicală permanentă, timp de 8 săptămâni (Tabel 3)

Tabel 3 Rezultate clinice și paraclinice privind efectul probiotic, imunomodulator și reacția digestivă la pacienți vârstnici

Parametru /varsta pacient	86	67	92	78	82	68	85	87	78
Tonus îmbunătățit/mai activ/ mai energetic	x	X	X	X	X	x	-	X	X
Modificare scaun	x	X	X	X	X	X	X	X	X
Flatulenta/accentuare/lipsa	-	-	-	-	-	X	-	-	X
Îmbunătățire tranzit	x	X	X	X	X	X	X	X	X
Balonare reducere	-	-	-	x	X	-	-	X	-
Ameliorare simptome diagnostic principal	-	X	X	x	X	X	x	X	-
Accentuare simptome diagnostic principal	X	X	-	-	x	X	-	-	x
A crescut rezistența la îmbolnăvire	-	X	X	X	X	X	-	-	X
Expunerea sezoniera/colectivități/viroze	x	-	-	X	X	X	X	-	X
Reducerea episoadelor de boala ca frecvență și intensitate	-	X	-	X	X	-	X	X	-
A crescut eficiența tratamentelor aplicate	x	x	X	-	-	X	X	X	x
Modificări imunogramă	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Concluzii:

- s-a observat îmbunătățirea tranzitului digestiv și au fost remediate diverse probleme digestive (balonare, flatulență, aspect scaun, diaree, constipație, infecții) efectul probiotic
- a crescut rezistența la îmbolnăvire, ameliorare simptomatologie diagnostic principal și a crescut eficiența tratamentelor aplicate
- s-a îmbunătățit tonusul , mai energici, mai activi
- efect imunomodulator demonstrat de modificările imunogramelor

3.2 A fost administrată pulbere orodispersabilă cu imunoglobuline Y și lizozim, **copiilor cu vârste cuprinse între 17 luni și 9 ani**, sub observația permanentă a părinților, timp de 8 săptămâni - 11 pacienți (Tabel 4, 5, 6).

Tabel 4 - Structură lot copii și afecțiuni prezentate

Status sanatare	Numar pacienti	Observatii
sănătos clinic	7	-
afecțiuni acute în evoluție	4	Bronșită acută/astm bronșic
afecțiuni cronice cunoscute	1	Dermatită atopică
îmbolnăviri frecvente	2/2	Afecțiuni respiratorii/astm viral
altele	3	Fond alergic(la polen), sensibilitate digestivă

Observații privind evoluția afecțiunilor prezente: ameliorare , dispariție , accentuare simptome

Tabel 5 – Evoluția afecțiunilor prezente

Evoluția afecțiunilor existente	Număr pacienți	Observații
Ameliorare simptome	2	Bronșită acută
Dispariție simptome	2	Bronșită acută/astm bronșic

Observații privind statusul imunitar creșterea rezistenței la îmbolnăvire, la expunerea sezonieră/colectivități viroze/parazitoze, reducerea episoadelor de boală ca intensitate și frecvență, a crescut eficiența tratamentelor aplicate în diferite afecțiuni

Tabel 6 - Evaluarea clinică a statusului imunitar

Evaluarea statusului imunitar	Număr pacienți
creșterea rezistenței la îmbolnăvire	11
reducerea episoadelor de boală ca intensitate și frecvență/dispariția simptomelor	9/2
a crescut eficiență tratamentelor aplicate în diferite afecțiuni	2

Concluzii:

- S-a observat creșterea rezistenței la îmbolnăvire după o administrare de 60 de zile.
- S-a observat creșterea eficienței tratamentelor aplicate în cazul virozelor respiratorii, după o administrare de 60 de zile.
- S-a observat ameliorarea sau dispariția simptomelor

4.Rezultate de laborator privind creșterea rezistenței nespecifice – prin monitorizarea unor efectori celulari – leucocite – funcție imunomodulare

S-a administrat Y.L.O.P. la pacienți cu leucopenii diagnosticate prin examene paraclinice-hemoleucograme, timp de două luni după care s-a făcut retestarea. Pacienți au trecut prin tratamente de lungă durată/infecții care au dus la instalarea imunodepresiei.

Administrarea s-a realizat în regim non-spitalicesc și rezultatele au fost furnizate de pacienți (Tabel 7).

Tabel 7 Rezultate privind creșterea numărului de leucocite

Nr. Crt.	Vârsta	Număr leucocite înainte de administrare pulbere mii/ μ l	Număr leucocite după administrare pulbere mii/ μ l	Durata administrării	Diagnostic principal
1	67 ani	3640	4500	2 luni	LLC
2	28 ani	1600	5000	2 luni	Cancer de sân
3	70 ani	2800	4000	2 luni	Hepatită virală
4	60 ani	2000	4500	2 luni	Hepatită virală
5	25 ani	3650	6500	2 luni	Hepatită virală
6	47 ani	1970	5030	2 luni	Cancer pulmonar, cerebral, hepatic

Concluzii: la pacienți cu vârste cuprinse între 25 și 70 de ani diagnosticați cu leucopenii, după administrarea pulberii orodispersabile cu imunoglobuline Y și lizozim s-a înregistrat creșterea numărului de leucocite, efectori celulari ai imunității și obținerea efectului imunomodulator.

5. Testarea conținutului de AGL prin metode enzimaticice

Pentru verificarea stadiului de oxidare a grăsimilor din YLOP s-au realizat teste specifice de laborator cu

Nr.	Varianta testată	V1	V2	V3	V4	V5	V6
Crt.	Parametrul analizat						
1.	Conținut de excipient	36%	46%	51%	30%	40%	50%
2.	Conținut grăsime	32%	28%	25%	35%	32%	26%
3.	Conținut acid OH-butiric mg/kg	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
4.	Conținut acid lactic g/kg	<0,0002	<0,0002	<0,0002	<0,0002	<0,0002	<0,0002

ajutorul Kit-urilor enzimaticice.

Tabel 8 Rezultate testelor enzimaticice privind conținutul de acizi grași liberi

Pulberile obținute au un conținut bogat în grăsimi susceptibile la oxidare în prezența oxigenului și la temperaturi ridicate.

Prin oxidare grăsimile sunt descompuse în acizi grași liberi AGL, acid lactic și OH-butiric care pot fi determinați cantitativ prin metode biologice. În standardele de calitate a alimentelor sunt stabilite limite maxime ale acestor compuși în produsele obținute din ouă. Conținutul de acid lactic permis în produsele din ouă este 1000mg/kg, iar cel de acid hidroxibutiric este de 10mg/kg.

Determinările realizate pe YLOP prin teste enzimaticice au evidențiat cantități foarte reduse de acid lactic și hidroxibutiric, mult sub limitele stabilite prin normele alimentare.

Concluzii: metoda de obținere în atmosferă controlată, în lipsa oxigenului creează condiții adecvate de procesare și protejează grăsimile din structura produsului, acestea nu sunt degradate prin oxidare aspect demonstrat de rezultatele de laborator (Tabel 8).

REVENDICĂRI

TITLUL BREVETULUI DE INVENȚIE:

**METODĂ DE OBȚINERE ȘI CARACTERIZARE A PULBERII ORODISPERSABILE
CU LIZOZIM ȘI IMUNOGLOBULINE Y CU FUNCȚIE NUTRITIVĂ, PROBIOTICĂ,
ANTIMICROBIANĂ ȘI IMUNOMODULATOARE**

ACRONIM: Y.L.O.P.

Obiectivul prezentei invenții se referă la metoda de obținere și caracterizare a pulberii orodispersabile cu imunoglobuline Y și lizozim cu funcție nutritivă, probiotică, antimicrobiană și imunomodulatoare - YLOP . Aceasta se obține din ouă sau diferite combinații ale componentelor acestora, opțional adaos de ingrediente cu recomandări pentru sănătate, prin aplicarea simultană a minimum două tehnici de anabioză.

În cadrul brevetului metoda de obținere a YLOP din ou integral, sau din combinații ale diferitelor componente ale oului sau din ingrediente imunologic active din ou în diferite proporții, opțional adaos de ingrediente cu recomandări pentru sănătate, asigură un conținut minim de ingrediente active: imunoglobuline, vitamine, minerale, factori de creștere, factori de transfer, enzime, lizozim , colagen etc. și substanțe nutritive, cu funcție probiotică, antimicrobiană, imunomodulatoare, nutritivă etc. .

Metodele aplicate pentru obținerea și caracterizarea a YLOP duc la următoarele rezultate:

- conservarea și stabilizarea microbiologică, fizică și chimică a pulberii orodispersabile, cu rezultat creșterea perioadei de păstrare prin uscare, adaosul de excipienți și procesarea în atmosferă inertă
- concentrarea componentelor nutritive și biologice din ou și păstrarea componentelor bioactive (de exemplu, imunoglobulina Y, vitamine , minerale , lizozimul etc), crește aportul de substanțe nutritive și energie , efect tonic și nutritiv
- îmbunătățirea palabilității și solubilității produsului, ceea ce îi conferă proprietăți orodispersabile
- efect probiotic prin restabilirea echilibrului florei digestive prin scăderea competiției bacteriene în tubul digestiv și neutralizarea toxinelor , refacerea mucoasei digestive și reducerea permeabilității intestinale, optimizarea absorbției nutrienților, reducerea tulburărilor digestive și reglarea tranzitului digestiv, îmbunătățirea digestiei

- efect imunomodulator, susține imunitatea organismului, inclusiv în cazul bolilor autoimune, crește rezistența la îmbolnăviri, ne îmbolnăvim mai rar, cu simptomatologie redusă, remisia mai rapidă, reduce stresul inflamator
- efect antimicrobian local și sistemic

- 1.Revendicarea potrivit căreia metoda de obținere YLOP este o metodă care se referă la producerea acesteia din ouă integrale sau orice combinație cu/și/din elemente izolate din oul integral, excipienți și opțional adaos de ingrediente cu recomandări pentru sănătate .
- 2.Revendicarea potrivit căreia metoda de obținere a YLOP se realizează prin aplicarea concomitentă a minimum două procese de anabioză (xeroanabioză, osmoanabioza, adaosul de excipienți etc.) .
- 3.Revendicarea potrivit căreia în metoda de obținere a YLOP adaosul de substanțe excipient are rol de conservant, rol de protecție, corector de gust , matriță suport , dezagregant etc.
4. Revendicarea potrivit căreia în metoda de obținere a YLOP se folosesc temperaturi moderate și atmosferă controlată care păstrează, concentrează și conservă componentele nutritive și biologice de interes
5. Revendicarea potrivit căreia metoda de obținere a YLOP poate fi utilizată ca și metodă de încorporare a diferitelor ingrediente active cu indicații pentru sănătate.
6. Revendicarea potrivit căreia prin metoda aplicată se obține o pulbere orodispersabilă cu multiple ingrediente bioactive (imunoglobuline Y, vitamine, minerale, lizozim etc) cu palabilitate, dezagregare și solubilitate îmbunătățite.
- 7.Revendicarea potrivit căreia YLOP asigură un conținut minim de ingrediente active: imunoglobuline, vitamine, minerale, factori de creștere, factori de transfer, enzime, lizozim , collagen etc. .
- 8.Revendicarea potrivit căreia YLOP are funcție probiotică, antimicrobiană, imunomodulatoare.
- 9.Revendicarea potrivit căreia YLOP poate fi folosit ca și sursă de substanțe nutritive, macro și microelemente.
- 10.Revendicarea potrivit căreia YLOP poate fi folosit pentru realizarea altor forme de prezentare comprimate, capsule, acadele, dropsuri etc.
- 11.Revendicarea potrivit căreia YLOP prin metoda aplicată se folosește ambalare în vid sau gaze inerte, în ambalaj multistrat cu rol de barieră de protecție față de factorii externi: gaze, vapori, lumină s.a.

FIGURI

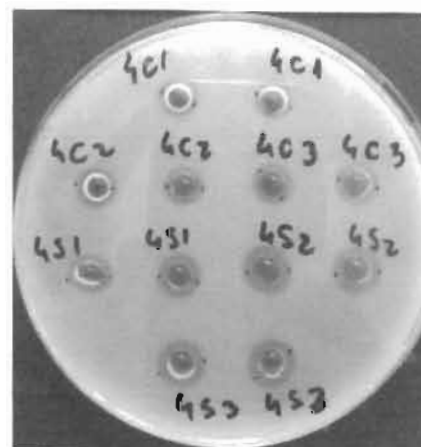
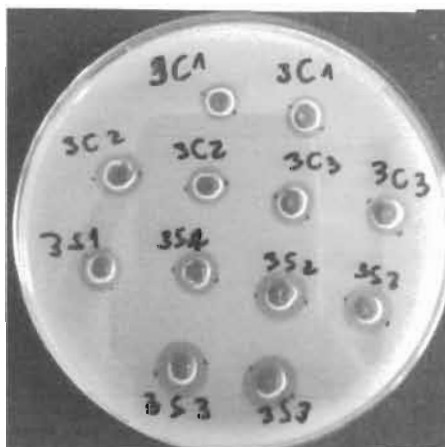
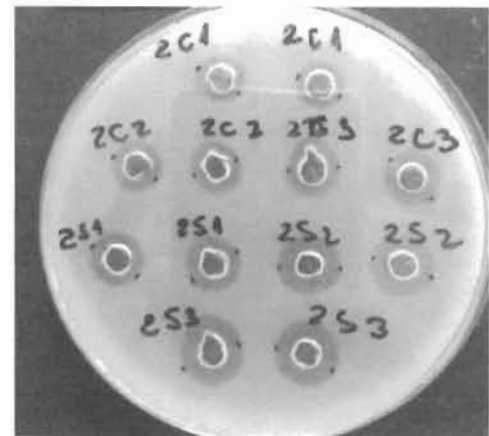
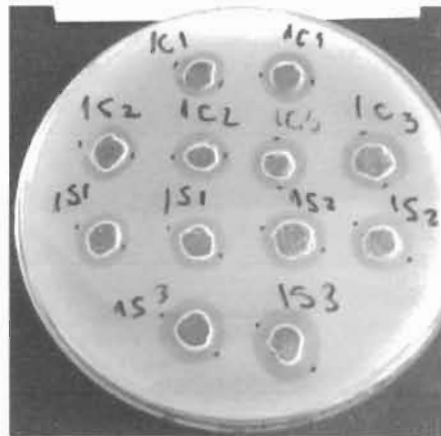
Figura 1. Imagine metoda difuzimetrică - Determinarea calitativă și cantitativă a lizozimului

Figura . 2

SCHEMA FLUXULUI TEHNOLOGIC

YLOP

