

## Stadiul si rezultatele obtinute in etapa 2

Raportul stiintific si tehnic in extenso este structurat in patru capitole, in care se prezinta activitatile din Planul de realizare, corespunzatoare fiecarui partener.

### **Activitatea 2.1 - Realizarea modelului experimental de obtinere si fractionare a principiilor bioactive din zer si din unele produse apicole si conservarea acestora prin refrigerare/ congelare/ liofilizare / atomizare, dupa caz (CO-ROMVAC)**

*Zerul* este un subprodus rezultat din fabricarea branzeturilor, ca urmare a coagularii cu cheag prin acidifiere naturala, obtinut al fabricarii cazeinei si a coprecipitatelor proteice. Valorificarea zerului prin procedee conventionale se realizeaza indeosebi pentru obtinerea unor produse destinate alimentatiei umane. In zer se gasesc intr-o proportie mai mare decat in lapte, proteine solubile, substante minerale si minerale hidrosolubile. Zerul este o excelenta sursa si de vitamine si lactoza. Proteinele din zer constau din  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, albumina serica, imunoglobuline si proteoza-peptone. Proteinele din zer contin cea mai mare concentratie de aminoacizi. Productia de anticorpi se realizeaza numai sub actiunea aminoacizilor, unul dintre cei mai importanti fiind cisteina.

Evacuarea in mediul inconjurator pune serioase probleme de poluare, accentuate de faptul ca un litru de zer are un consum biochimic de oxigen (CBO) de 50.000 mg/litru. Cea mai rationala si profitabila forma de valorificare a zerului este indrumarea sa catre alimentatia umana si catre furajare, deziterat caruia isi propune sa raspunda si activitatea noastra din prezentul proiect. Exista o gama larga de produse si subproduse ale stupului care pot fi valorificate in cadrul unor formule de suplimente nutritive, formule medicamentoase sau cosmetice, ca atare sau in asociere cu derivate din diferite alte baze, in cazul nostru, din zer si membrane cochiliere.

*Propolisul, polenul, capaceala, ceara, mierea*-produse ale stupului-sunt bine cunoscute in medicina traditionala, iar utilizarile si aplicatiile lor s-au extins din aria alimentelor sanatoase la cea medicala si farmaceutica. Prezenta cercetare a plecat de la beneficiile produselor apicole, avand ca rezultat studiul extractelor de propolis, capaceala, polen in scopul folosirii lor ca materii prime pentru formularea de preparate farmaceutice. Extractele obtinute s-au caracterizat prin analize microbiologice, spectrofotometrice, cromatografice si fizico-chimice si s-au utilizat ca materii prime in formulari farmaceutice, precum pasta de dinti, apa de gura, crema, supozitoare, sirop, jeleuri s.a., tinandu-se cont de proprietatile biomedicale pe care le poseda (efect antimicrobian, antioxidant, cicatrizant si imunomodulator).

Modelele experimentale privind obtinerea si conservarea unor principii active din zer pe de o parte si unele produse apicole pe de alta parte, au stat la baza intocmirii si dezvoltarii unor programe de cercetare (fise de cercetare) derivate din desfasuratorul de activitati al prezentului contract. Programul a fost defalcat pe subactivitati specifice pentru fiecare directie, echipele respective intocmind de asemenea fise de cercetare subsidiare, cu scopul obtinerii, purificarii caracterizarii si configurarii unor precursori pentru procesele tehnologice, care s-au dezvoltat in capitolul 2.4. Ne referim la proteine, solutii si medii cu glucide, saruri minerale, aminoacizi, enzime, structuri mai elaborate, cum ar fi **chitosanul si policosanolul** (inca nefinalizate) precum si culturi de microorganisme (*Kluyveromyces*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*) care urmeaza sa fie introduse in formule de suplimente nutritive cu probiotice. Modelele experimentale au cuprins si o serie de tehnici de control, analiza si caracterizare a derivatelor respective.

## **Activitatea 2.2 - Realizarea modelelor experimentale de separare a membranei cochiliere de coaja de ou (P1- ICECHIM)**

Cojile de oua si membranele, considerate deseuri, sunt o resursa regenerabila de compusi bioactivi cu valoare economica, si care se pot extrage dupa separarea eficienta a membranelor de cojile de oua. Se cunosc numeroase intrebuintari ale cojilor de oua si ale membranelor detasate, dar putine pentru cojile integrale. Separarea membranelor este dificila si limiteaza valoarea deseurilor de oua, din cauza interactiunii cristalelor de carbonat de calciu cu matricea organica. In aceasta etapa s-au realizat mai multe modele experimentale de separare.

Cel mai simplu procedeu consta in desprinderea manuala a membranelor de pe coajile de oua. De la 1 ou de dimensiuni medii se obtin cca. 4,9 g coaja si 0,13g membrane. Membranele detasate se spala cu apa distilata, se usuca in etuva la 30<sup>0</sup>C timp de 30 minute, apoi se macina si se pastreaza in congelator. Acest procedeu este usor, se foloseste cel mai mult la nivel de laborator, dar este ineficient si dureaza mult.

Tratamentul cu acizi diluati (acid acetic/acid clorhidric/EDTA/acid sulfuric) dizolva carbonatul de calciu al cochiliei si separa membranele, care se pot recupera. S-au efectuat tratamente cu acid acetic glacial 50%, randamentul separarii fiind de 60,8% si cu EDTA tetrasodic, in doua variante experimentale, singur si in amestec cu acid acetic glacial 8%. Randamentul separarii a fost de 44,3%. Pentru recoltarea membranelor detasate s-au folosit doua metode: NaCl si suflanta cu aer.

Se prezinta fluxul tehnologic de obtinere a membranelor cochiliere.

Separarea membranelor prin tratare cu ultrasunete s-a realizat in trei variante folosind o baie ultrasonica la 35kHz. Separarea membranelor prin acest procedeu nu duce la obtinerea celor doua componente.

Dintre metodele experimentate de separare a membranelor, tratamentul cu acizi diluati este un procedeu non-agresiv, care permite extractia ulterioara a proteinelor. S-a constatat ca reducerea dimensiunii particulelor de coji de oua diminueaza eficienta procesului de separare.

**Activitatea 2.3 - Obținerea experimentală a Ca organic din coaja de ou și a membranelor cochilere hidrolizate și conservarea acestora prin metode adecvate (uscarea-liofilizare /atomizare / refrigerare, congelare) (P1-ICECHIM)**

*Obținerea experimentală a Ca organic din coaja de ou*

Calciul este un mineral esential, necesar pentru mentinerea echilibrului electrolytic in organism și pentru functionarea adecvata a numeroase mecanisme de reglare. In general, se considera ca bioaccesibilitatea calciului este influentata de pH-ul din stomac, unde are loc ionizarea lui, ceea ce asigura o buna absorbtie la nivel intestinal.

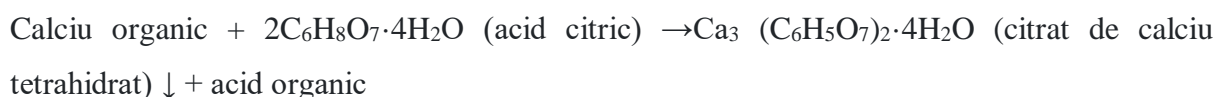
Cele mai comune forme de suplimente alimentare de calciu sunt carbonatul de calciu ( $\text{CaCO}_3$ ), cu cea mai mare concentratie de calciu elemental (40%) și citratul de calciu [ $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ ], al carui continut in calciu este de 21%

Au fost realizate modelele experimentale de obtinere a carbonatului de calciu și a citratului de calciu, sarurile cele mai utilizate ca suplimente și aditivi alimentari.

Pentru obtinerea  $\text{CaCO}_3$  cojile de oua se pretrateaza prin spalare cu apa de robinet, iar dupa separarea membranelor se spala cu apa distilata, se fierb 20 de minute pentru distrugerea microorganismelor patogene, se usuca in etuva, la  $120^\circ\text{C}$ , timp de 2 ore și se macina. Pentru purificarea produsului, peste pulbere se adauga apa distilata rece și se lasa in repaus timp de o ora, dupa care se usuca in etuva la  $105^\circ\text{C}$ , pana la greutate constanta.

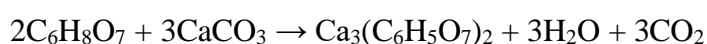
Citratul de calciu s-a obtinut prin doua metode: a. prin inlocuire; b. prin reactia dintre acidul citric și carbonatul de calciu.

a.  $\text{CaCO}_3$  din cojile de oua se dizolva cu acid acetic, obtinandu-se acetatul de calciu, peste care se adauga acid citric, care induce o reactie de inlocuire in urma careia se obtine citratul de calciu cu puritate mare. Ecuatia reactiei este urmatoarea:



În urma aplicării acestei metode s-a obținut un randament de citrat de calciu brut de 53,6%. Pentru purificare, citratul de calciu brut se dizolvă în acid citric în concentrație de 0,0070 mol/L, se agită câteva minute la temperatura de 100°C și soluția se filtrează pentru îndepărtarea impurităților.

b. S-a realizat obținerea citratului de calciu utilizând metoda tradițională, care are la bază reacția dintre acidul citric și carbonatul de calciu, conform reacției



Amestecul de pulbere de coji de ouă și soluția de acid citric 6% se lasă în repaus să reacționeze 2-3 zile, la temperatura camerei. Randamentul de citrat de calciu brut este de 30,80%. Se constată că nu toată cantitatea de coji s-a dizolvat în soluția de acid citric, iar o cantitate mică de citrat de calciu insolubil a rămas în fază apoasă. În urma unor studii efectuate s-a stabilit că solubilitatea carbonatului de calciu crește prin mărirea concentrației de acid citric.

Conservarea carbonatului de calciu și a citratului de calciu se face prin uscare.

#### *Obținerea experimentală a membranelor cochilare hidrolizate*

Membranele cojilor de ouă au ca și compus principal proteinele, care pe lângă valoarea lor nutrițională, au și un rol esențial în procesele fiziologice ale organismului, rol pe care și-l exercită în urma hidrolizei parțiale, în scopul producerii de peptide bioactive.

Hidroliza proteinelor se poate realiza cu enzime (Alcalaza 2,4L, Viscozyme L, Proteaza), cu baze tari (NaOH) sau cu acizi.

Pentru hidroliza enzimatică, amestecul de coji de ouă cu membrane se suspendă în apă distilată în raport 1:30 g/mL și se tratează ultrasonic. După ajustarea pH-ului la 8,5 proba se preincubează la temperatura de 55°C, 15 minute, după care se porneste reacția de hidroliza prin adăugarea a 1,5 mL enzima, timp de opt ore. Se obțin 0,017g precipitat proteic.

Hidroliza alcalină a proteinelor se realizează sub acțiunea bazelor tari, la cald, rezultând ruperea legăturilor peptidice până la aminoacizi și peptide. Proba de coji de ouă cu membrane se suspendă în soluție NaOH 5%, și se incubează 24 ore, la 37°C. Supernatantul obținut în urma centrifugării se ultrasonifică. Se ajustează pH-ul la 8,5 cu HCl concentrat. Pentru înlăturarea NaCl format în soluția de proteine solubile din membrane, supernatantul se dializează față de apă distilată timp de 24 ore. Se obțin 0,72g de precipitat proteic.

Într-o altă variantă experimentală hidroliza alcalină a fost urmată de hidroliza enzimatică, obținându-se 0,46 g precipitat proteic.

Precipitarea proteinelor, pentru cele trei metode experimentate, s-a realizat prin scăderea pH-ului până la atingerea punctului izoelectric la pH între 3,5-4. Procentul de

proteina solubilizata se calculeaza prin determinarea cantitatii de azot din proba si din membrane prin metoda Kjeldahl.

Dintre metodele utilizate pentru obtinerea hidrolizatelor proteice din cojile de oua cu membrane nedetasate, cea mai eficienta este hidroliza alcalina. Tratamentul cu ultrasunete favorizeaza desprinderea fragmentelor de proteine.

Conservarea probelor se face prin uscare-liofilizare.

#### *Caracterizarea fizico-chimica a hidrolizatelor proteice*

Dupa obtinerea membranelor cochiliere hidrolizate, se preleveaza probe de 20 mL, care se analizeaza din punct de vedere fizico-chimic. Natura proteica a fost demonstrata prin fluorescenta si spectroscopie FT-IR, atat la proba inainte de procesare cat si la proba in timpul procesarii.

Pentru determinarea oligopeptidelor obtinute in urma hidrolizei alcaline a membranelor cochiliere se utilizeaza cromatografia de lichide de faza inversata cu spectrometrie de masa.

Pentru studiul aminoacizilor liberi prezenti s-a procedat la cromatografia de lichide de tip HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography), un tip de cromatografie de faza inversata cu coloana proprie fazei normale. Au fost pusi in evidenta aminoacizi hidrofobi (prolina, valina, hidroxiprolina, leucina+izoleucina, fenilalanina, triptofan) cunoscuti pentru activitate antioxidanta.

Caracterizarea hidrolizatelor proteice pe baza greutatilor moleculare s-a realizat prin analiza electroforetica SDS-PAGE (sodium dodecil sulfat poliacrilamida gel), in cadrul laboratorului de analize al partenerului coordonator al proiectului –ROMVAC-.

In urma efectuarii testului SDS PAGE pentru cele trei probe se identifica fractiuni proteice cuprinse intre ~14.45kDa si ~70.60kDa.

**Act 2.4 - Realizarea tehnologiilor de obtinere a suplimentelor alimentare pe baza de principii bioactive din zer si produse apicole, realizate sub una sau mai multe dintre urmatoarele forme de conditionare: bauturi, pulberi, pulberi hidrosolubile, efervescente, tablete, capsule, batoane. Realizarea tehnologiilor de obtinere a produselor pe baza de principii bioactive, de uz extern, preparate sub una dintre formele de conditionare creme, geluri, lotiuni (CO-ROMVAC)**

Tehnologiile de obtinere a suplimentelor alimentare si cosmeticelor se bazeaza pe un flux operational care cuprinde identificarea surselor de principii active (zer, ou, stup), extragerea substantelor de interes cum s-a prezentat in capitolul anterior - 2.1., analiza si testarea acestora-preformulare, realizarea unor formule de produse prin amestecuri, conditionare sub forma de solutii, geluri, creme etc, deshidratarea prin procedee moderne,

cum ar fi liofilizarea, formarea unor amestecuri omogene cu pulberile rezultate, tabletare, ambalare finala si control specific final.

In urma activitatii desfasurate, diferitele echipe din cadrul companiei ROMVAC au obtinut o serie de preparate cum ar fi vehiculele bioactive-conditionate prin deshidratare controlata-**liofilizare: *Organicbioactiv-baza 1*** - amestec format din retentat de zer, miere, polen, extract de capaceala in PEG 400 (S1), extract de propolis in PEG 400 (S1) si amidon in solutie-suspensie, ***Organicbioactiv-baza 2*** - amestec format din miere, extract de capaceala in PEG 400 (S1), extract de propolis in PEG 400 (S1), amidon in solutie-suspensie si dioxid de siliciu, ***Organicbioactiv-baza 3*** - amestec format din retentat de zer 10 kDa, miere, polen, extract de capaceala in PEG 400 (S1), extract de propolis in PEG 400 (S1), amidon in solutie-suspensie si dioxid de siliciu, ***Organicbioactiv-baza 4*** - amestec format din retentat de zer 5kDa, miere, polen, extract de capaceala in PEG 400 (S1), extract de propolis in PEG 400 (S1), amidon in solutie-suspensie si dioxid de siliciu.

Suplimente nutritive, cosmetice sau produse medicamentoase, ca: Organicbioactiv **ROMBIOTIC 3** - Pulberea liofilizata Baza 4, in care s-au integrat pulberi liofilizate cu *Kluyveromyces marxianus*, *Lacobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, concentrat de zer liofilizat, plus adaosuri specifice necesare tabletarii, Organicbioactiv **ORALTRAT** - solutie aspersabila cu aplicare orala formata din propolis, capaceala si uleiuri volatile - uleiul de pin si uleiul de salvie, Organicbioactiv - **MELIFIVE-cream** - amestec dupa o formula specifica cu alte elemente - collagen, ceara de albine purificata in cadrul proiectului, vitamine, uleiuri volatile, extracte vegetale, emulgatori etc, Organicbioactiv – **OROCLEAN Apa de gura A, Ceara de albine purificata**, precum si o serie intrega de preparate realizate din propolis si polen, cu mentiunea ca, acestea vor reprezenta si vehicule pentru principii bioactive obtinute din zer si ou, la prezentul proiect de cercetare: Pasta de dinti cu extract apos de propolis si polen – Organicbioactiv – **DENTIPROP**, Apa de gura cu extract apos de propolis si polen– Organicbioactiv – **DENTIPROP AQUA**, Supozitoare cu propolis– Organicbioactiv – **PROPOCOL** cu propolis, Supozitoare cu polen – Organicbioactiv – **PROPOCOL** cu polen, Crema cu propolis – Organicbioactiv – **PROPOCREAM** cu propolis, Crema cu polen– Organicbioactiv – **PROPOCREAM** cu polen, Sirop cu propolis si polen– Organicbioactiv – **SIRUPROP**, Jeleuri cu propolis si polen – Organicbioactiv – **PROPOJELLY**.

Avand o compozitie complexa in proteine, bioflavonoide, minerale, vitamine, enzime, aminoacizi si oligoelemente, aceste ingrediente naturale provenite din cele trei grupe de materiale (zer, ou, apicole) poseda proprietati remarcabile si benefice pentru organismul uman. Formulate in diferite preparate pentru utilizare ca suplimente nutritive cat si ca

administrare topica si sistemica pot completa alimentatia si ajuta la prevenirea, tratamentul si ameliorarea unor afectiuni cu diverse etiologii.

Fiecare produs rezultat prezinta proprietati si actiuni specifice, combinatia lor in diferite preparate farmaceutice conduce la un sinergism de potentare a unor efecte benefice rezultand formule complexe si complete pentru sanatatea organismelor.