



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2023 00698

(22) Data de depozit: 15/11/2023

(41) Data publicării cererii:
30/05/2024 BOPI nr. 5/2024

(71) Solicitant:
• VIO NUTRI LAB S.R.L., STR.SERGEANT
CONSTANTIN APOSTOL, NR.16E, AP.1102,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• TRYVYZAS NIKOS, STR.SERGEANT
CONSTANTIN APOSTOL, NR.16E, AP.1102,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• TRITEAN NAOMI, STR.PERFEȚIONĂRII,
NR.11, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• CONSTANTINESCU- ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU NR.297, BL.15A, SC.A,
AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• DIMITRIU LUMINIȚA, ALEEA BARAJULUI
BICAZ, NR.9, BL.M31, SC.B, ET.2, AP.408,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE CREȘTERE A BIODISPONIBILITĂȚII
ȘI EFICACITĂȚII COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN POLENUL
COLECTAT DE ALBINE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de prelucrare a polenului colectat de albine în scopul creșterii biodisponibilității și eficacității compușilor activi din grăuncioarele de polen. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: fermentarea semisolidă a polenului colectat de albine, omogenizat împreună cu 0,5 g miere polifloră la 9,5% polen, la temperatura camerei, timp de 2 zile, amestecarea a 30 g polen fermentat semisolid cu 200 ml apă distilată și ultrasonareatimp de 5 min. la 750 W și o frecvență de 30 kHz, adăugarea a 8 g tărâțe de grâu și 4 g huște care conțin cel puțin 10^8 ufc/g

lactobacili și fermentare timp de 3 zile la 30°C, măcinarea amestecului timp de 1 min., ultrasonarea tip de 20 min, urmată de răcirea amestecului la 4°C, timp de 2 h și uscarea prin liofilizare, rezultând polen care eliberează cantități suplimentare de compuși bioactivi, polifenoli și siliciu solubil, respectiv, acizi hidroxicinamici și pre- și post-biotici, cu menținerea bioactivității compușilor termolabili și creșterea duratei de păstrare.

Revendicări: 1

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <u>a 2023 0698</u>
Data depozit <u>15-11-2023</u>

RO 138174 A0

30

PROCEDEU DE CREȘTERE A BIODISPONIBILITĂȚII ȘI EFICACITĂȚII COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN POLENUL COLECTAT DE ALBINE

Prezenta invenție se referă la un procedeu de creștere a biodisponibilității și eficacității compușilor bioactivi din polenul colectat de albine, în primul rând polifenoli și biosiliciu, al cărui scop este îmbunătățirea calității suplimentelor nutritive, dispozitivelor medicale și/sau produselor cosmetice pe bază de polen.

Sunt cunoscute o serie de procedee pentru creșterea biodisponibilității compușilor bioactivi din polen. Acești compuși bioactivi din polen includ polifenolii (Rzepecka-Stojko et al. 2015, *Molecules*, 20(12), 21732-21749), în special flavonoidele (Algethami et al. 2022, *Nutrients*, 14(14), 2858), și mineralele (Thakur și Nanda, 2020, *Trends in Food Science & Technology*, 98, 82-106), inclusiv siliciu solubil (Uțoiu et al. 2018, *Nutrients*, 10(10), 1365). Biodisponibilitatea acestor compuși din polen este redusă cu peste 50% datorită structurii peretelui grăunciorului de polen (Kostić, et al. 2020. *Biomolecules*, 10(1), 84). Componenta principală a peretelui celular al grăunciorului de polen este sporopolenina, un biopolimer care nu este biodegradabil și care are o rezistență mecanică remarcabilă (Maruthi și Ramakrishna 2022, *International Journal of Biological Macromolecules*, 222, 2957-2965).

Cererea de brevet RO135449 A2 se referă la un procedeu de obținere a unor comprimate masticabile cu polen și vitamina C naturală. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de pulverizare a polenului de albine pulbere până la un grad de finețe de 200...800 μm , prepararea extractelor uscate din fructe de măceșe, cătină, acerola, merișoare sau coacăze și standardizarea acestora în conținutul de acid ascorbic, respectiv, acid ascorbic și beta-caroten, prepararea comprimatelor masticabile prin amestecarea a 100...500 părți în greutate polen, 45...100 părți extract standardizat, 25...50 părți miere ca agent liant și 75...150 părți glucoză, eventual un aromatizant, calibrarea umedă și uscată a granulatului și comprimarea acestuia, rezultând comprimate cu o greutate de 0,5...2 g, cu aspect marmorat, gust dulce și biodisponibilitate îmbunătățită.

Cererea de brevet RO135449 A2 menționează creșterea biodisponibilității, dar nu revendică etape care să determine ruperea peretelui grăunciorului de polen și creșterea biodisponibilității rezultată din această rupere a peretelui celular.

Brevetul RU 2538635 C2 prezintă un procedeu de prelucrare a polenului de albine care implică extragerea componentelor lipofile cu bioxid de carbon supercritic, urmată de

hidroliza enzimatică a fracției hidrofile. Fermentatul este separat în faze solidă și lichidă, faza solidă este uscată, iar faza lichidă este filtrată și conservată prin adăugarea de sorbat de potasiu și benzoat de sodiu. Acest procedeu folosește conservanți chimici care au o acceptabilitate redusă pentru consumatori. Defectul său major este însă dat de faptul că prin operațiile de extracție și fracționare distruge complexitatea sistemului reprezentat de compușii bioactivi din polen.

În general, dezavantajul unor astfel de procedee care urmăresc fracționarea și purificarea componentelor bioactive din polen este dat de faptul că distrug sisteme complexe în încercarea de a le crește biodisponibilitatea. Un produs complex este mai mult decât suma părților sale componente, datorită caracteristicilor emergente, adică "comportamente neașteptate care rezultă din interacțiunea dintre componentele unei aplicații și mediul lor" (Johnson, *Reliability Engineering & System Safety*, 91(12), 1475-1481). Una dintre cele mai cunoscute proprietăți emergente în sistemele complexe este sinergia, adică îmbunătățirea reciprocă a activităților biologice ale diferitelor ingrediente biologic active. În general, compușii biologici sunt mai activi în combinațiile lor naturale față de compușii extrași.

O soluție de creștere a biodisponibilității compușilor bioactivi din polen este cea de fermentare cu microorganisme. Această soluție este biomimetică, pentru că este similară modului în care este crescută biodisponibilitatea componentelor bioactive în păstură – polenul fermentat de albine (Aylanc et al. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 464-481).

Cererea de brevet WO2020016770 A1 descrie un procedeu biotehnologic pentru producerea unui polen fermentat care cuprinde inocularea polenului cu cel puțin o bacterie lactică din specia *Lactobacillus kunkeei* selectată dintre tulpinile *L. kunkeei* PF12 (DSM 32843), PF13 (DSM 32845) și/sau PL13. (DSM 32844) și fermentarea polenului inoculat cu bacteriile lactice inoculare. Polenul fermentat obținut are proprietăți nutritive și organoleptice asemănătoare păsturii produse în mod natural în interiorul fagurelui stupului și își găsește aplicație în domeniul alimentar și nutraceutic. Procedeu brevetat include tulpinile de *L. kunkeei* PF12 (DSM 32843), PF13 (DSM 32845) și/sau PL13 (DSM 32844) ca atare și compoziții care cuprind aceste tulpini.

Cererea de brevet CN115537344 A dezvăluie un procedeu pentru îmbunătățirea conținutului și activității substanțelor antioxidante din polenul de pin prin utilizarea fermentației cu *Rhizopus oryzae*. Procesul cuprinde următoarele etape: prepararea unui mediu de cultură lichid de polen de pin, inocularea cu *R. oryzae* și fermentarea pentru a

obține un produs de fermentație. Conform metodei descrise în invenție, conținutul de polifenoli, conținutul de flavone și activitatea antioxidantă a polenului de pin sunt îmbunătățite prin fermentare.

Dezavantajul unor astfel de procedee în care se aplică doar procedee de fermentare este dat de acțiunea exclusiv biochimică asupra peretelui celular. În cazul păsturei are loc și un proces de dezagregare mecanică a peretelui celular, datorită masticării grăuncioarelor de polen de către albinele lucrătoare (Kieliszek et al. 2018, *Trends in Food Science & Technology*, 71, 170-180).

Cererea de brevet CN112956668 A descrie un procedeu care implică măcinarea fină a polenului, urmată de suspendarea în apă distilată, într-un raport material-lichid de 1:10-1:30 și ajustarea pH-ului la $6 \pm 0,5$, tratarea cu ultrasunete la o putere de 800 W și o frecvență de 80 kHz la 30 grade C timp de 15 minute și hidroliza enzimatică secvențială. Hidroliza enzimatică secvențială implică adăugarea a 5% pectinază, efectuarea hidrolizei enzimatică la 45°C, pH 5, timp de 6 ore, adăugarea de 10% papaină, efectuarea hidrolizei enzimatică la 55°C, pH 5, timp de 6 ore, adăugarea de 8% celulază și efectuarea hidrolizei enzimatică la 55 grade C, pH 5, timp de 6 ore.

Cererea de brevet DE102010022994 A1 revendică un procedeu care implică omogenizarea polenului într-un omogenizator cu piston la 100 MPa, urmată de fermentarea cu *Streptococcus*. Lichidul fermentat este fie folosit pentru obținere de băuturi, fie este filtrat steril și uscat prin liofilizare.

Dezavantajul acestor procedee este că aplică aceste etapele de dezagregare mecanică indusă de forțele de forfecare din lichide, înaintea celor biochimice (enzimatice, microbiologice) și nu în timpul sau după acestea. Prin fermentarea polenului are loc nu numai o creștere a biodisponibilității ingredientelor bioactive din polen, ci și o formare a unor compuși post-biotici care cresc valoarea biologică a produselor rezultate (Uțoiu et al 2018, *Nutrients*, 10(10), 1365). Intercalarea etapelor de dezagregare mecanică și de fermentare amplifică formarea compușilor post-biotici, care potențează compușii bioactivi din polenul colectat de albine, crescându-le eficacitatea.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu combinat, prin care procesele de fermentare și dezagregare mecanică prin forțe de forfecare induse în lichide să se potențeze reciproc pentru a crește biodisponibilitatea și pentru a se mări eficacitatea compușilor bioactivi din grăuncioarele de polen, datorită ruperii pereților celulari și combinării acțiunii componentelor bioactive din polen cu cele produse în fermentație.

Procedeeul conform invenției constă în următoarele etape:

- ✓ Fermentarea semisolidă a polenului colectat de albine, omogenizat împreună cu 0,5 gram de miere polifloră la 9,5 grame de polen, la temperatura camerei, timp de 2 zile;
- ✓ Amestecarea a 30 grame de polen fermentat semisolid, cu 200 ml de apă distilată și ultrasonarea timp de 5 min la 750 W și o frecvență de 30 kHz;
- ✓ Adăugarea peste cele 30 grame de polen fermentat semisolid, omogenizate în 200 ml de apă, a 8 grame de tărațe de grâu și 4 grame de huște care conțin cel puțin 10^8 ufc/g lactobacili, și fermentarea timp de 3 zile la 30 grade;
- ✓ Măcinarea coloidală a polenului fermentat, tărațelor și huștelor, împreună cu mediul de fermentație timp de 1 min, ultrasonarea timp de 20 min la 750W și o frecvență de 30 kHz, urmată de răcirea amestecului la 4°C timp de 2 ore și uscarea prin liofilizare.

Procedeeul prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Eliberează cantități semnificative de compuși bioactivi, polifenoli și siliciu solubil, din grăuncioarele de polen, datorită acțiunii combinate a proceselor de fermentare și dezagregare mecanică;
- ✓ Combină acțiunea fermentativă a bacteriilor lactice fructofile de pe polen și a bacteriilor lactice din borș pentru a elibera compuși bioactivi din grăuncioarele de polen;
- ✓ Eliberează cantități suplimentare de acizi hidroxicinamici și de siliciu din tărațe, care potențează suplimentar acțiunea compușilor bioactivi din polen;
- ✓ Formează compuși para-probiotici ca urmare a inactivării și ruperii pereților celulari ai bacteriilor lactice sub acțiunea ultrasunetelor;
- ✓ Combină acțiunea compușilor bioactivi din polen cu acțiunea compușilor pre- și post-biotici formați ca urmare a dezvoltării bacteriilor lactice specifice borșului;
- ✓ Menține bioactivitatea compușilor termolabili și crește durata de păstrare datorită uscării prin liofilizare.

În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

Exemplul 1. Se iau 38 grame de polen polifloral cules de albine și se omogenizează cu 2 grame de miere polifloră. Analiza palinologică a polenului cules de albine arată o compoziție majoră semnificativă de 40% polen de *Helianthus annuus*, și o componentă minoră semnificativă, de 5-10%, de *Robinia pseudoacacia*, *Zea mays*, *Tilia* spp., *Fagus sylvatica*. Se lasă la temperatura camerei, într-un borcan de 400 ml sterilizat,

timp de 2 zile. Se iau 30 grame de polen fermentat semisolid, pe care s-au dezvoltat bacteriile lactice fructofile specifice polenului și mierii, și se trec într-un alt borcan de sticlă, sterilizat prin autoclavare (10 min, 121°C), împreună cu 200 ml apă distilată. Se introduce sonotroda unui echipament de ultrasonare (Sonics VCX-750 Vibracell Ultrasonic, Sonics, Newtown, CT, SUA) și se ultrasonează timp de 10 min la 750 W și o frecvență de 30 kHz. Peste cele 30 grame de polen omogenizate în 200 ml de apă se adaugă 8 grame de tărâțe de grâu și 4 grame de huște. Tărâțele de grâu au un conținut de 68,8 g/100 g s.u. carbohidrați, 2,3 g/100 g s.u. proteine, 3,9 g/100 g s.u. lipide, și fibre 25,1 g/100 g s.u. Huștele, provenite din sedimentul de la o cultură de borș, conțin cel puțin 10^8 ufc/g lactobacili. Borcanul este acoperit cu tifon steril și păstrat la 30°C timp de 3 zile.

După cele 3 zile polenul fermentat, tărâțele și huștele se trec împreună cu mediul de fermentație printr-o moară coloidală cu stator-rotor (magic LAB®, IKA, Staufen, Germania) timp de 1 min. Suspensia rezultată este colectată în borcanul de 400 ml în care s-a făcut fermentarea și este ultrasوناتă cu un echipament de ultrasonare (Sonics VCX-750 Vibracell Ultrasonic, Sonics, Newtown) timp de 20 min la 750W și o frecvență de 30 kHz. Amestecul rezultat se răcește la frigider la 4°C timp de 2 ore. Se trece în incinta unui liofilizator (CoolSafe 4-15 L, LaboGene, Lilerod, Danemarca) și se usucă.

În proba de polen fermentat se determină polifenolii totali, flavonoide totale, acizi hidroxicinamici totali, activitatea antioxidantă (FRAP), siliciul solubil, activitate antimicrobiană și citocompatibilitate. Analizele au fost făcute comparativ pe polen menținut în apă (30 grame în 200 ml apă), borș și polen fermentat conform acestui Exemplet 1.

S-a determinat conținutul total de polifenoli (TPC) prin metoda Folin-Ciocalteu (Dimitriu et al., 2022, *Antioxidants* 11, 2194). Peste 10 μ L de probă / standard s-au adăugat 90 μ L de apă bidistilată. După adăugarea a 10 μ L de reactiv Folin-Ciocalteu, placa a fost agitată timp de 5 minute. Peste soluția obținută s-au pipetat 100 μ L de Na_2CO_3 7% și 40 μ L de apă bidistilată. După incubarea plăcii la temperatura camerei timp de 60 de minute s-au înregistrat valorile absorbanțelor la $\lambda = 765$ nm. Curba de calibrare s-a realizat pornind de la o soluție stoc de 500 μ g/mL acid galic în etanol 70%, în intervalul de concentrații 0-250 μ g/mL (CLARIOstar BMG Labtech, Ortenberg, Germania).

Pentru determinarea conținutului total de flavonoide (TFC) s-au amestecat 25 μ L de probă / standard cu 25 μ L acetat de sodiu 10%, 30 μ L AlCl_3 2.5% și 170 μ L apă distilată. După 45 de minute de incubare la temperatura camerei, absorbanta a fost măsurată la $\lambda = 430$ nm folosind un cititor de plăci. Curba de calibrare s-a realizat pornind

de la o soluție stoc de 500 $\mu\text{g/mL}$ quercetină în etanol 70%, în intervalul de concentrații 0-100 $\mu\text{g/mL}$ (Dimitriu et al., 2022, *Antioxidants* 11, 2194).

Conținutul total de acizi hidroxicinamici (HAY) a fost determinat printr-o metodă adaptată după European Pharmacopoeia 7.0 (EDQM, 2011). Peste 25 μL de probă / standard s-au adăugat 50 μL HCl 0,5 M, 50 μL de soluție de 1% azotit de sodiu și 1% molibdat de sodiu, 50 μL de NaOH 8,5% și 75 μL de apă bidistilată. Probele au fost agitate și citite spectrofotometric la $\lambda = 524$ nm folosind un cititor de plăci. Pentru determinarea conținutului de acizi hidroxicinamici s-a realizat o curbă de calibrare pornind de la o soluție stoc de 1 mg/mL acid clorogenic, în intervalul de concentrații 0-300 $\mu\text{g/mL}$ (Dimitriu et al., 2022, *Antioxidants* 11, 2194).

Pentru determinarea activității antioxidante FRAP s-au preparat 3 soluții, respectiv tampon acetat de sodiu 300 mM, pH=3,6, 10 mM TPTZ în 40 mM HCl și 20 mM FeCl_3 în apă bidistilată. Reactivul FRAP a fost preparat prin amestecarea a 10 părți de soluție tampon acetat de sodiu 300 mM, pH=3,6 cu o parte soluție TPTZ 10 mM și o parte soluție de FeCl_3 20 mM (10:1:1). Reactivul FRAP a fost ținut pe baie de apă la temperatura de 37°C. Peste 15 μL probă / standard s-au adăugat 285 μL reactiv FRAP, soluția obținută fiind incubată timp de 30 minute la temperatura de 37°C la întuneric. După incubare, probele au fost centrifugate la 6000 rcf, iar absorbanta a fost citită la $\lambda = 593$ nm utilizând un cititor de plăci. Curba de calibrare a fost realizată în intervalul de concentrații 0-450 μM Trolox, pornind de la o soluție stoc de Trolox 10 mM în etanol (Thaipong et al., 2006, *Journal of food composition and analysis*, 19, 669-675)

Siliciul solubil, a fost determinat spectrofotometric prin citirea absorbantei la $\lambda = 410$ nm, conform protocolului din kitul Supelco Silicate Test (1.00857.0001, MQuant@Supelco, Merck, Darmstadt, Germania) pentru determinarea siliciului (acid silicic). Pentru determinarea conținutului de siliciu solubil din borș, polen și borș cu polen s-a folosit kitul MQuant® Colorimetric Test (Merck, Darmstadt, Germania). Astfel, peste 20 mL de proba martor / probă diluată s-au adăugat 3 picături din reactivul Si-1. Amestecul a fost agitat și incubat timp de 3 minute la temperatura camerei. Ulterior, au fost adăugate 3 picături din reactivul Si-2 și 10 picături din reactivul Si-3, iar probele au fost agitate și incubate timp de 2 minute la temperatura camerei. Concentrația de siliciu solubil a fost determinată cu ajutorul gradației de culoare în intervalul 0,01 la 0,25 mg/L Si.

Activitatea anti-microbiană a fost determinată față de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, prin metoda semicantitativă a difuziei.

Testele de evaluare a biocompatibilității au fost realizate pe fibroblaste gingivale (HGF-1, ATCC). Analiza viabilității și proliferării celulare s-a realizat după 24 h de la tratament prin combinarea testului LIVE/DEAD care utilizează calceina-AM (acetoximetil) și homodimerul de etidiu (EthD-1) pentru diferențierea celulelor viabile (fluorescență verde) de celulele moarte (fluorescență roșie), cu testul CCK-8, ce cuantifică numărul de celule viabile metabolic active. Calceina AM reacționează cu esterazele intracelulare ale celulelor viabile și emite o fluorescență verde la $\lambda=494/517$ nm. Homodimerul de etidiu pătrunde în nucleul celulelor cu membrana plasmatică lezată, se intercalează între bazele azotate ale acizilor nucleici și emite o fluorescență roșie la $\lambda=528/617$ nm. Testul CCK-8 se bazează pe reducerea unei sări de tetrazoliu, WST-8, de către dehidrogenazele celulare, la un formazan de culoare galbenă, solubil în mediul de cultură, care este evaluat spectrofotometric la $\lambda=450$ nm. Testul LIVE/DEAD conține 2 compuși care acționează simultan: calceină acetoximetil ester (AM) și homodimerul de etidiu (EthD-1). Astfel, în vederea examinării microscopice a celulelor la 24h de menținere în contact cu bioprodusele, cultura a fost vizualizată la sistemul de imagistică celulară CelenaX High Content Imaging System, achiziția de imagini realizându-se cu ajutorul softului CelenaX Explorer.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Caracteristicile polenului fermentat conform Ex.1 comparativ cu polen menținut în apă și borș

	Polen menținut în apă	Borș	Polen fermentat Exemplu 1
TPC (μg acid galic/mL)	7,2 \pm 0,34	5,6 \pm 0,18	28,3 \pm 1,2
TFC (μg quercitină/mL)	2,8 \pm 0,12	2,4 \pm 0,08	12,9 \pm 0,4
HAT (μg acid chlorogenic/mL)	1,4 \pm 0,07	2,7 \pm 0,12	7,3 \pm 0,3
FRAP (μM echiv. Trolox/ mL)	1240 \pm 67	1160 \pm 82	3828 \pm 124
Si solubil (mg/l)	7,2 \pm 0,34	5,6 \pm 0,18	28,3 \pm 1,2
Activitate anti-microbiană	1,21 \pm 0,11	1,62 \pm 0,23	8,78 \pm 0,85
Citocompatibilitate	92,2 \pm 8,3	91 \pm 8,1	109 \pm 3,2

Rezultatele demonstrează o creștere semnificativă a activității biologice a polenului fermentat conform Exemplu 1, comparativ cu polen menținut în apă și borș. Această creștere este datorată solubilizării compușilor bioactivi din polen și potențării lor

prin compușii pre- și post-biotici produși în timpul fermentării. De remarcat și creșterea semnificativă de aproximativ 10% față a numărului de celule viabile metabolic active în cazul probei cu polen fermentat.

Exemplu 2. Se lucrează ca în exemplul 1, cu singura diferență că se folosește polen de albine la care analiza palinologică arată o compoziție majoră semnificativă de 40% polen de *Tillia* spp. și o componentă minoră semnificativă, de 5-10%, de *Allium* spp., *Helianthus annuus*, *Asteraceae* spp. Rezultatele testelor sunt similare celor obținute în cazul probei din Exemplu 1.

Exemplu 3. Se lucrează ca în exemplul 1, cu singura diferență că se folosește polen de albine la care analiza palinologică arată o compoziție majoră semnificativă de 40% polen de *Robinia pseudoacacia*, și o componentă minoră semnificativă, de 5-10%, de *Cucumber* spp., *Castaneae* spp., *Rosaceae* spp. Rezultatele testelor sunt similare celor obținute în cazul probei din Exemplu 1.

Exemplul 4. Se lucrează ca în exemplul 1, cu singura diferență că se folosește polen de albine la care analiza palinologică arată o compoziție majoră semnificativă de 40% polen de *Zea mays*, și o componentă minoră semnificativă, de 5-10%, de *Trifolium* spp., *Quercus* spp., *Prunus* spp. Rezultatele testelor sunt similare celor obținute în cazul probei din Exemplu 1.

Exemplul 5. Se lucrează ca în exemplul 1, cu singura diferență că se folosește polen de albine la care analiza palinologică arată o compoziție majoră semnificativă de 40% polen de *Robinia pseudoacacia*, și o componentă minoră semnificativă, de 5-10%, de *Salicaceae* spp., *Sophora* spp., *Poaceae* spp. Rezultatele testelor sunt similare celor obținute în cazul probei din Exemplu 1.

Revendicări

1, Procedeul conform invenției caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: fermentarea semisolidă a polenului colectat de albine, omogenizat împreună cu 0,5 gram de miere polifloră la 9,5 grame de polen, la temperatura camerei, timp de 2 zile; amestecarea a 30 grame de polen fermentat semisolid, cu 200 ml de apă distilată și ultrasonarea timp de 5 min la 750 W și o frecvență de 30 kHz; adăugarea peste cele 30 grame de polen fermentat semisolid, omogenizate în 200 ml de apă, a 8 grame de tărâțe de grâu și 4 grame de huște care conțin cel puțin 10^8 ufc/g lactobacili, și fermentarea timp de 3 zile la 30 grade; măcinarea coloidală a polenului fermentat, tărâțelor și huștelor, împreună cu mediul de fermentație timp de 1 min, ultrasonarea timp de 20 min la 750W și o frecvență de 30 kHz, urmată de răcirea amestecului la 4°C timp de 2 ore și uscarea prin liofilizare.