

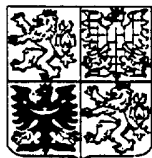
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

281 797

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2081-93**

(22) Přihlášeno: 09. 04. 92

(30) Právo přednosti:
12. 04. 91 US 91/684590

(40) Zveřejněno: 16. 03. 94

(47) Uděleno: 03. 12. 96

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 12. 02. 97

(13) Druh dokumentu: **B6**

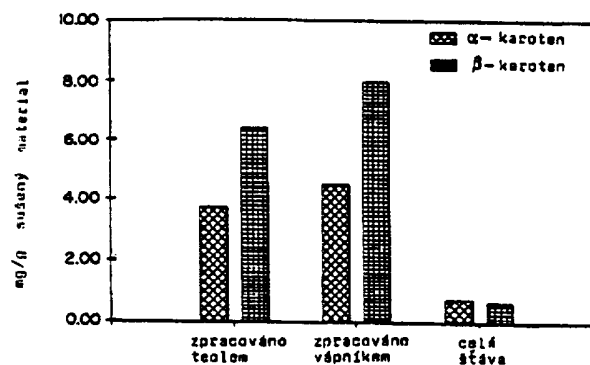
(51) Int. Cl.⁶:
C 07 C 403/00
C 07 C 7/00

(73) Majitel patentu:
**HUMANETICS CORPORATION, Chaska, MN,
US;**

(72) Původce vynálezu:
Graves Frederic A., Ham Lake, MN, US;
Gallaher Daniel D., Roseville, MN, US;

(54) Název vynálezu:
**Způsob extrakce karotenoidů
z přírodních zdrojů**

(57) Anotace:
Způsob extrakce karotenoidů z přírodního zdroje bez použití uhlovodíkového rozpouštědla zahrnuje stupně a) rozdělení přírodního zdroje karotenoidů na kapalnou frakci, obsahující karotenoidy, a kašovitou frakci, b) kontakt kapalně frakce se srážecím činidlem, prostým uhlovodíkového rozpouštědla, vybraným ze skupiny, zahrnující 0,5 až 3 % hmotn. chloridu vápenatého, 0,05 až 2 % hmotn. hydroxidu vápenatého, 2 až 4 % hmotn. laktátu vápenatého a 4 až 6 % hmotn. glukonátu vápenatého, vztaženo na kapalnou frakci, tak, že se kapalná frakce rozdělí na pevnou vysráženou část, obohacenou o karotenoidy, a kapalnou část, ochuzenou o karotenoidy, přičemž jak pevná, tak kapalná část jsou prosty uhlovodíkového rozpouštědla, a c) oddělení pevné části obohacené karotenoidy od kapalně části ochuzené o karotenoidy bez použití uhlovodíkového rozpouštědla tak, že se vytvoří karotenoidy obohacený pevný extrakt, který nebyl uveden do styku s uhlovodíkovým rozpouštědlem během extrakce.



CZ 281 797 B6

Způsob extrakce karotenoidů z přírodních zdrojů

Oblast techniky

Vynález se týká extrakce karotenoidů z přírodních zdrojů, obsahujících karotenoidy. Specificky se vynález týká extrakce karotenoidů z přírodních zdrojů jako je mrkev, odšťavněním mrkve, zpracováním šťávy s činidlem, srážejícím karotenoidy, zahrnujícím chlorid vápenatý, hydroxid vápenatý, laktát vápenatý nebo glukonát vápenatý, za vzniku pevné vysrážené části obohacené karotenoidy a kapalného podílu zbaveného karotenoidů, a oddělení pevného a kapalného podílu.

Dosavadní stav techniky

Karotenoidy jsou skupinou přirozeně se vyskytujících pigmentů, nacházejících se ve stopových množstvích ve tkáních vyšších rostlin, řas, bakterií a hub. Karotenoidy jsou polyeny, mající C_{40} uhlikatý skelet (fytoen), který obsahuje rozsáhlou síť jednoduchých a dvojných vazeb. Různé karotenoidy jsou tvořeny chemickou modifikací tohoto C_{40} uhlikatého skeletu. Například dehydrogenace fytoenu poskytne karotenoid lykopen, který je odpovědný za barvu rajčat a cyklizace obou konců lykopenu poskytne karotenoid β -karoten, který je odpovědný za barvu mrkve.

Karotenoidy, jako je β -karoten, jsou cennými pigmenty vhodnými pro barvení různých potravin jako je margarín, protože odstraňují ohrožení zdraví spojená se syntetickými pigmenty a okamžitě vykazují významnou nutriční hodnotu (β -karoten je prekurzor pro tvorbu retinalu a vitamínu A u lidí).

Protože se karotenoidy vyskytují pouze ve stopových množstvích, musí být karotenoidy extrahovány v koncentrované formě, aby bylo možno je využít. Obvykle se karotenoidy extrahují z přírodních zdrojů zpracováním materiálu s uhlovodíkovým rozpouštědlem, solubilizujícím karotenoidy, jako je hexan nebo chloroform, oddělením uhlovodíkového rozpouštědla, obsahujícího karoten od zbylého materiálu a pak odstraněním uhlovodíkového rozpouštědla za vzniku pevného produktu obohaceného karotenoidem.

Spolu s karotenoidy obsahují rostliny mnoho dalších složek, které jsou rozpustné v uhlovodíkových rozpouštědlech, jako jsou různé proteiny a lipidy. V souladu s tím, pevný produkt obohacený karotenoidy typicky obsahuje významná množství jiných složek spolu s karotenoidem(y).

Použití uhlovodíkového rozpouštědla pro extrakci karotenoidů výrazně zvyšuje náklady a složitost extrakčního postupu náklady na uhlovodíkové rozpouštědlo, náklady na odstranění uhlovodíkového rozpouštědla z konečného produktu, náklady na regeneraci odstraněného uhlovodíkového rozpouštědla a náklady na likvidaci kontaminovaného uhlovodíkového rozpouštědla, které nemůže být znovu použito. Dále použití uhlovodíkového rozpouštědla pro účinnou extrakci karotenoidů vede k významnému zatížení životního prostředí uvolněním par uhlovodíků do atmosféry a potřebou likvidace kontaminovaného uhlovodíkového rozpouštědla, které nemůže být znovu použito.

Existuje tedy výrazná potřeba jednoduchého a pro životní prostředí bezpečného způsobu extrakce karotenoidů z přírodních zdrojů, obsahujících karotenoidy, který nebude využívat uhlovodíkové rozpouštědlo.

Podstata vynálezu

Byl objeven způsob extrakce karotenoidů z přírodních zdrojů, obsahujících karotenoidy, jako je mrkvová šťáva, bez použití uhlovodíkového rozpouštědla, který zahrnuje stupně

a) rozdělení přírodního zdroje karotenoidů na kapalnou frakci, obsahující karotenoidy, a kašovitou frakci,

b) kontakt kapalně frakce se srážecím činidlem, prostým uhlovodíkového rozpouštědla, vybraným ze skupiny, zahrnující 0,5 až 3 % hmotn. chloridu vápenatého, 0,05 až 2 % hmotn. hydroxidu vápenatého, 2 až 4 % hmotn. laktátu vápenatého a 4 až 6 % hmotn. glukonátu vápenatého, vztaženo na kapalnou frakci, tak, že se kapalná frakce rozdělí na pevnou vysráženou část, obohacenou o karotenoidy, a kapalnou část, ochuzenou o karotenoidy, přičemž jak pevná, tak kapalná část jsou prosty uhlovodíkového rozpouštědla, a

c) oddělení pevné části obohacené karotenoidy od kapalně části ochuzené o karotenoidy bez použití uhlovodíkového rozpouštědla tak, že se vytvoří karotenoidy obohacený pevný extrakt, který nebyl uveden do styku s uhlovodíkovým rozpouštědlem během extrakce.

Pevná frakce obohacená karotenoidy může být použita přímo nebo může být dále čištěna tak, že se oddělí karotenoid(y) od jiných složek pevného podílu jakoukoliv vhodnou separační technikou. Výhodné techniky zahrnují chemickou a enzymatickou hydrolýzu a chemickou a enzymatickou degradaci, čímž se nekarotenoidní složky učiní schopnými oddělení od karotenoidu(ů) ve vodném médiu. I když může pevná frakce, obsahující karotenoid, být čištěna za použití obvyklých extrakcí organické kapalně nebo pevné fáze, použití takových extrakcí porušuje požadovaný charakter procesu, představovaný nepřítomností rozpouštědel, a není žádoucí.

Kontakt kapalně frakce s chloridem vápenatým jako srážecím činidlem se výhodně provádí při teplotě 40 až 60 °C a po dobu alespoň 10 až 30 min. Jinak se kapalná frakce uvádí do kontaktu se srážecím činidlem při teplotě 80 až 120 °C na dobu menší než 20 min, výhodně menší než 2 min. Hodnota pH kapalně frakce je výhodně mezi 6 až 8.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 - je sloupcový graf získaný z údajů v tabulce 1 představující koncentraci karotenu získaného ze zpracované a nezpracované mrkvové šťávy.

Obr. 2 - je sloupcový graf představující stupeň oddělení karotenoidu dosažený přidávkou od 0,5 do 2 % hmotn. různých solí k celé mrkvové šťávě s nejvyšším stupněm oddělení dosaženým pro každou sůl v testovaném rozsahu koncentrací uvedeném ve grafu.

Obr. 3 - je sloupcový graf, představující stupeň oddělení karotenoidu, dosažený přidavkem různých koncentrací vápenatých solí k celé mrkvové šťávě.

Obr. 4 - je sloupcový graf, představující rychlost oddělení karotenoidu, dosaženou přidavkem chloridu vápenatého k celé mrkvové šťávě při různých hodnotách pH.

Karotenoidem obohacený pevný produkt může být jednoduše, rychle a účinně extrahován z karotenoid obsahujících přírodních zdrojů, jako je mrkev, (i) rozdělením karotenoid obsahujícího přírodního zdroje na kapalnou frakci, obsahující karotenoid a kašovitou frakci, (ii) zpracováním kapalně frakce, obsahující karotenoid se srážecím činidlem karotenoidu, zahrnujícím chlorid vápenatý, hydroxid vápenatý, laktát vápenatý nebo glukonát vápenatý tak, že se kapalná frakce rozdělí na pevný vysrážený podíl obohacený karotenoidem a kapalný podíl ochuzený o karotenoid a (iii) oddělením kapalných a pevných podílů obvyklými způsoby.

Předpokládá se, že v podstatě všechny přírodní zdroje, obsahující karotenoid, mohou být účinně frakcionovány v souladu s vynálezem, pro získání produktu obohaceného karotenoidem, a tyto zahrnují, ale nejsou na ně omezeny ovoce jako jsou ananasy a pomeranče; zeleninu jako je mrkev, špenát, sladké brambory a rajčata; řasy jako je *Dunaliella Salina*; bakterie jako jsou bakterie řádu *Mucorales*, zahrnující *C.trispora* a *Blakeslea Circinans*; a houby. Vzhledem k dostupnosti, nízké ceně a vysoké koncentraci obchodně cenného β -karotenu je preferovaným výchozím materiálem mrkev.

Prvním stupněm ve způsobu podle vynálezu je rozdělení přírodního zdroje, obsahujícího karotenoid na kapalnou frakci, obsahující karotenoid a kašovitou frakci. I když přesný mechanismus použitý pro dosažení tohoto rozdělení závisí na různých faktorech, zahrnujících specifický karotenoidový zdroj, může být takové dělení typicky provedeno dosažením jednoduchého odšťavnění karotenoidového zdroje a filtrací šťávy běžným filtrem o vhodné velikosti ok. Rozrušení buněčné struktury zdroje karotenoidu během dělení vede k přechodu karotenoidu(ů) v karotenoidovém zdroji z kašovité frakce do kapalně frakce.

Přídavek činidla, srážejícího karotenoid, zahrnujícího chlorid vápenatý, hydroxid vápenatý, laktát vápenatý nebo glukonát vápenatý, ke kapalně frakci, obsahující karotenoid, vyvolá srážení frakce, obohacené karotenoidem, která může být oddělena od zbývající o karotenoid ochuzené frakce obvyklými dělicími metodami.

Fyzikální a/nebo chemické mechanismy odpovědné za toto srážení pevné frakce, obohacené karotenoidem přidavkem zdroje ionizovatelného vápníku není plně jasný. Pro zjištění, zda se pektin a/nebo proteiny obsažené v kapalně frakci podílejí na tomto fenomenu, byly vzorky mrkvové šťávy zpracovány s enzymem proteasou a enzymem pektinasou před přidáním činidla, srážejícího karotenoid, chloridu vápenatého (viz tabulka 3 a připojené poznámky). Takové předchozí zpracování s enzymem pro degradaci proteinů (proteasa) a pektinu (pektinasa), obsažených ve šťávě, vede k nepatrné změně ve frakcionaci šťávy chloridem vápenatým. Zdá se, že

proteiny a pektin obsažené v kapalné frakci, obsahující karotenoid, nehrají nezávislou aktivní roli ve fyzikálním a/nebo chemickém mechanismu odpovědném za srážení karotenoidem obohacené pevné frakce z kapalné frakce přidavkem uvedených karotenoid srážejících činidel.

Pro získání srovnatelné frakcionace s jinými minerálními solemi jako je chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid hořečnatý, uhličitán vápenatý a fosforečnan vápenatý a zásad jako je hydroxid sodný a hydroxid draselný, byly tyto shledány jako v podstatě nedostatečné (viz obr. 2 a protokol o zpracování solí). Zdá se, že pouze činidla schopná poskytnout účinnou frakcionaci jsou ta, která jsou schopna poskytnout ionizovaný vápník za podmínek, které jsou ve šťávě, jako je chlorid vápenatý, hydroxid vápenatý, laktát vápenatý a glukonát vápenatý, přitom chlorid vápenatý poskytuje výrazně lepší dělení při nižších koncentracích.

Vzhledem k obr. 3 - vynikajícího dělení karotenoidů do odděleného pevného vysráženého podílu může být dosaženo z kapalné frakce, obsahující karotenoid z přírodního zdroje, obsahujícího karotenoid, přidavkem chloridu vápenatého v koncentracích od 0,01 do 10 % hmotn., výhodně 0,05 až 3 % hmotn., hydroxidu vápenatého v koncentracích od 0,01 do 10 % hmotn., výhodně 0,05 až 3 % hmotn., laktátu vápenatého v koncentracích od asi 2 do 10 % hmotn., výhodně 2 až 4 % hmotn. a glukonátu vápenatého v koncentracích od 4 do 10 % hmotn., výhodně 4 až 6 % hmotn., s nejlepším celkovým oddělením dosaženým s chloridem vápenatým.

Podle obr. 1 a tabulky I může být kapalná frakce výrazně frakcionována zahřátím kapalné frakce na alespoň 60 °C.

Oddělení kapalné frakce zpracováním s uvedenými činidly srážejícími karotenoid v souladu se způsobem podle vynálezu může být provedeno za podmínek okolí. Nicméně pro dosažení zvýšení rychlosti oddělování, zahřívá se kapalná frakce výhodně nad 40 °C a výhodně na teplotu mezi 40 až 60 °C, za současného zpracovávání s jedním z uvedených činidel, srážejících karotenoid.

Účinné frakcionace může být dosaženo zpracováním kapalné frakce s jedním z uvedených činidel pro srážení karotenoidu za tak krátkou dobu jako je asi jedna minuta (viz tabulka II a přípojené poznámky). I když některé faktory mohou ovlivňovat optimální dobu kontaktu jako je použité specifické činidlo, srážející karotenoid, koncentrace činidla, srážejícího karotenoid, teplota kapalné frakce a typ zdroje, obsahujícího karotenoid, probíhá účinná frakcionace obecně za dobu kratší než jedna hodina a specifickěji kratší než třicet minut. Optimální frakcionace se obecně dosahuje u mrkvové šťávy zahřáté na mírně zvýšenou teplotu a zpracovávanou s jedním z uvedených karotenoid srážejících činidel při době kontaktu asi pět až deset minut. Kontaktní doba menší než asi pět minut vede k mírně méně účinnému dělení, zatímco kontaktní doby větší než deset minut produkují v malém množství další dělení.

Předpokládá se, že optimální frakcionace může být také dosaženo zpracováním kapalné frakce s jedním z uvedených činidel, srážejících karotenoidy po dobu menší než pět minut, možná i menší než jedna minuta, při použití teploty mezi 80 až 120 °C.

Podle obr. 4 a tabulky IV může pH kapalně frakce ovlivňovat rychlost dělení a celou účinnost dělení. Mrkvová šťáva má přirozené pH asi 6,0. Mrkvová šťáva, mající pH upravené pomocí NaOH na 6 až 7 podle potřeby poskytuje nejúplnější dělení (čistší kapalná frakce), zatímco když je upraveno na 10 až 11 poskytuje téměř okamžité oddělení po přidavku činidla, srážejícího karotenoid.

Dělení pevného vysráženého podílu obohaceného karotenoidem od kapalně podílu ochuzeného o karotenoid může být provedeno jakoukoliv obvyklou metodou, zahrnující odstředění /dekantaci/ lyofilizaci; odstředění /dekantaci/ sušení teplem; sušení teplem, odpaření a podobně.

Pevný podíl obohacený karotenoidem může být použit bez dalšího zpracování je-li žádoucí pigmentace poskytovaná koncentrovaným karotenoidem(y). Je-li to žádoucí může dále být pevný podíl obohacený karotenoidem dále rafinován pro oddělení karotenoidu(ů) od jiných vysrážených složek jako je popel, uhlohydráty, lipidy a proteiny a získán koncentrovanější produkt, obsahující karotenoid použitím obvyklých technik čištění jako je chemická a enzymatická hydrolýza, chemická a enzymatická degradace, extrakce kapalina-kapalina, extrakce pevné fáze atd.

Příklady provedení vynálezu

Protokol srovnávacího testu

Mrkev se odšťavní desintegrátorem a šťáva se oddělí od kaše odstředěním nebo lisováním. Šťáva se rozdělí na tři 40ml vzorky a umístí se do 125ml Erlenmeyerových nádob. První vzorek se ponechá nezpracován. Druhý vzorek se zahřeje ponořením vzorku do vodní lázně udržované na 60 °C na dvacet minut. Třetí vzorek se zpracuje s dihydrátem chloridu vápenatého a pak se zahřeje ponořením vzorku do vodní lázně udržované na 60 °C na dvacet minut.

Vzorky se odstřeďují po 15 minut při 2 000 x g za vzniku pevné pelety a kapalně supernatantu. Supernatant se od pevné pelety odlije a peleta se lyofilizuje. Lyofilizované pelety se analyzují na koncentrace α - a β -karotenu za použití HPLC technologie podle pracovního HPLC protokolu uvedeného dále.

HPLC zkušební protokol

Lyofilizované pelety se upráškovají v hmoždíři s paličkou. Přibližně 0,025 gramů každého vzorku se přidá ke 4 ml vody. Tato směs se pak extrahuje třikrát 10mililitrovými podíly směsi petrolether : aceton (50 : 50 obj./obj. a filtruje Büchnerovou nálevkou. Filtrační koláč se odloží a filtrát se odpaří dosucha pod dusíkem. Výsledný sušený extrakt se resuspenduje ve 4 mililitrech čistého chloroformu. 1ml vzorek resuspendovaného extraktu se zředí 4 mililitry chloroformu. Zředěný extrakt se filtruje přes 0,45 μ m filtr a pak se analyzuje vysokotlakovou kapalinovou chromatografií (HPLC) podle postupu uvedeného v Journal of Food Science, Vol. 52, č. 3, str. 744-46, 1987 na obsah α a β -karotenu.

Obsah karotenu ve vzorku se kvantifikuje porovnáním plochy píku s plochou píku autentických standardů o známé koncentraci

získaných od Sigma Chemical Co. Použité koncentrace standardu byly 12,5, 25,0, 50,0 a 100,0 $\mu\text{g/ml}$.

Miligramy α a β -karotenu na gram sušeného pevného materiálu jsou uvedeny na obr. 1.

Zpracování pomocí různých solí (zkušební protokol)

Mrkev se odšťavní desintegrátorem a šťáva se od kaše oddělí odstředěním nebo lisováním. Šťáva se rozdělí na 40ml vzorky a umístí do 125ml Erlenmeyerových baněk. Jednotlivé vzorky se zpracují se solí vybranou z chloridu sodného, hydroxidu draselného, hexahydrátu chloridu hořečnatého, dihydrátu chloridu vápenatého, chloridu draselného, hydroxidu sodného, uhličitanu vápenatého, fosforečnanu vápenatého, hydroxidu vápenatého, laktátu vápenatého a glukonátu vápenatého v koncentracích 0,5, 1,0 a 2,0 % hmotn. po šest minut. Stav separace byl sledován a zaznamenán podle následující stupnice.

Stupnice

- 0 = žádné dělení
- 1 = slabé dělení
- 2 = přijatelné dělení
- 3 = dobré dělení
- 4 = vynikající dělení

Nejllepší stupeň dělení získaný pro každou ze solí v testovaných koncentracích, je graficky znázorněn na obr. 2.

Zpracované vzorky se odstřeďují 15 minut při 20 °C a 2 000 x g za tvorby pevné pelety a kapalného supernatantu. Supernatant se dekantuje z pevné pelety a peleta se lyofilizuje.

Zpracování solí, kterou jsou soli vápníku (protokol testu)

Mrkev se odšťavní v desintegrátoru a šťáva se oddělí od kaše odstředěním nebo lisováním. Šťáva se rozdělí na 40ml vzorky a umístí do 125ml Erlenmeyerových baněk. Duplikáty vzorků se zpracují s vápenatou solí vybranou z dihydrátu chloridu vápenatého, uhličitanem vápenatým, fosforečnanem vápenatým, hydroxidem vápenatým, laktátem vápenatým a glukonátem vápenatým v koncentracích 1, 2 a 4 mmol na šedesát minut. Pozoruje se průběh dělení a zaznamenává podle následujícího hodnocení.

Hodnocení

- 0 = žádné dělení
- 1 = slabé dělení
- 2 = přijatelné dělení
- 3 = dobré dělení
- 4 = vynikající dělení

Stupeň dělení získaný pro každou z vápenatých solí v každé koncentraci je graficky znázorněn na obr. 3.

Zpracované vzorky byly odstředěny po 15 minut při 25 °C a 2 000 x g za vzniku pevné pelety a kapalného supernatantu. Su-

pernatant byl dekantován od pevné pelety a peleta byla lyofilizována.

Zpracování teplem a solí (zkušební protokol)

Mrkev se odšťaví desintegrátorem a šťáva se oddělí od kaše odstředěním nebo lisováním. Šťáva se rozdělí na 40ml vzorky a umístí do 125ml Erlenmeyerových baněk. Vzorky se zpracují se solí (sůl-typ) a v množství (sůl-gram) uvedenými v tabulce II a ponoří při konstantní teplotě do vodní lázně zahřáté na 60 °C na dobu (doba kontaktu) uvedenou v tabulce II. Sleduje se dělení a zaznamenává podle dále uvedeného hodnocení.

Hodnocení

- 0 = žádné dělení
- 1 = slabé dělení
- 2 = přijatelné dělení
- 3 = dobré dělení
- 4 = vynikající dělení

Zpracované vzorky se odstřeďují po 15 minut při 25 °C a 2 000 x g za vzniku pevné pelety a kapalného supernatantu. Supernatant se dekantuje z pevné pelety a peleta se lyofilizuje.

Zpracování teplem, solí a enzymem (zkušební protokol)

Mrkev se odšťavní desintegrátorem a šťáva se oddělí od kaše odstředěním nebo lisováním. Šťáva se rozdělí na 40ml vzorky a umístí do 125ml Erlenmeyerových baněk. Vzorky se zpracují s enzymem typu (enzym-typ) a v množství (enzym-gram) uvedených v tabulce III. Vzorek, obsahující enzym se ponoří do vodní lázně o konstantní teplotě uvedené v tabulce III (tepl. láz.) na dobu uvedenou v tabulce III (kontakt doba teplo + enzym). Vzorky zpracované enzymem/teplem se zpracují se solí typu (sůl-typ) a v množství (sůl-gram) uvedených v tabulce III po dobu (kontakt doba-sůl) uvedenou v tabulce III. Sleduje se dělení a zaznamenává se podle následující stupnice.

Hodnocení

- 0 = žádné dělení
- 1 = slabé dělení
- 2 = přijatelné dělení
- 3 = dobré dělení
- 4 = vynikající dělení

Zpracované vzorky se odstřeďují po 15 minut při 25 °C a 2 000 x g za vzniku pevné pelety a kapalného supernatantu. Supernatant se oddekantuje z pevné pelety a peleta se lyofilizuje.

Zpracování pomocí CaCl a pH (zkušební protokol)

Mrkev se odšťavní desintegrátorem a šťáva se oddělí od kaše odstředěním nebo lisováním. Šťáva se rozdělí na 40ml vzorky a umístí do 125ml Erlenmeyerových baněk. pH vzorků se upraví na 8, 9, 10 nebo 11 roztokem 10N NaOH a pak se zpracuje s 0,294 g dihydrátu chloridu vápenatého po 30 minut. Vynikající oddělení

bylo pozorováno u všech vzorků. Byla zaznamenávána doba požadovaná pro dosažení vynikajícího oddělení po přidavku chloridu vápenatého.

Hodnocení

- 0 = žádné dělení
- 1 = slabé dělení
- 2 = přijatelné dělení
- 3 = dobré dělení
- 4 = vynikající dělení

Zpracované vzorky byly odstředovány po 15 minut při 25 °C a 2 000 x g za vzniku pevné pelety a kapalného supernatantu. Supernatant byl slit z pevné pelety a peleta byla lyofilizována.

Zpracování teplem, solí a pH (zkušební protokol)

Mrkev byla odšťavněna desintegrátorem a šťáva byla oddělena od kaše odstředěním nebo lisováním. Šťáva byla rozdělena na 40ml vzorky a umístěna do 125ml Erlenmeyerových baněk. pH vzorků bylo upraveno jak je uvedeno v tabulce IV roztokem 10N NaOH, byly zpracovány 0,294 g dihydrátu chloridu vápenatého a pak ponořeny do vodní lázně o konstantní teplotě 60 °C na deset minut. Vynikající oddělení bylo pozorováno u všech vzorků. Průběh dělení byl sledován a zaznamenán podle následujícího hodnocení.

Zpracované vzorky byly odstředovány po 15 minut při 25 °C a 2 000 x g za vzniku pevné pelety a kapalného supernatantu. Supernatant byl oddekantován od pevné pelety a peleta byla lyofilizována.

Tabulka I

Porovnání koncentrací karotenu
teplem zpracovaný/vápníkem zpracovaný/nezpracovaný karoten

č.	tepl. lázn. (°C)	kontakt. dobu v láz. (min.)	sůl (typ)	sůl (mmol)	koncentrace		celkem (mg/g) (mg/l)
					α (mg/g) (mg/l)	β (mg/g) (mg/l)	
100	-	-	-	-	(0,679) (72,0)	(0,683) (72,5)	(1,362) (144,5)
101	60	20	-	-	(3,73) (46,75)	(6,40) (80,0)	(10,13) (126,75)
102	60	20	CaCl ₂	2	(4,48) (56,0)	(7,96) (99,5)	(12,44) (155,5)

Zjištění: Jak teplem, tak vápníkem zpracovaná mrkvová šťáva produkuje koagulát, který je vysoce obohacen α a β karoteny. Nejvíce α a β karotenu v celé šťávě je získáno těmito způsoby. Zpracování teplem kombinované se zpracováním vápníkem se jeví jako zvyšující celkové množství karotenu (α a β) o asi 23 % proti množství získanému pouhým tepelným zpracováním.

Tabulka II

Teplo + anorganické sole

č.	kontakt. doba (min)	sůl (typ)	sůl (gram)	dělení
200a	20	CaCl_2	(0,294)	4
200b	20	CaCl_2	(0,294)	4
201a	20	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	(0,148)	4
201b	20	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	(0,148)	4
kontrl.	10	-	-	4
kontrl.	10	-	-	4
kontrl.	20	-	-	4
kontrl.	20	-	-	4
210a	05	CaCl_2	(0,147)	4
210b	05	CaCl_2	(0,147)	4
211a	10	CaCl_2	(0,147)	4
211b	10	CaCl_2	(0,147)	4
212a	20	CaCl_2	(0,147)	4
212b	20	CaCl_2	(0,147)	4
213a	05	CaCl_2	(0,294)	4
213b	05	CaCl_2	(0,294)	4
214a	10	CaCl_2	(0,294)	4
214b	10	CaCl_2	(0,294)	4
215a	20	CaCl_2	(0,294)	4
215b	20	CaCl_2	(0,294)	4
216a	05	CaCl_2	(0,544)	4
216b	05	CaCl_2	(0,544)	4
217a	10	CaCl_2	(0,544)	4
217b	10	CaCl_2	(0,544)	4
218a	20	CaCl_2	(0,544)	4
218b	20	CaCl_2	(0,544)	4

pokus

200a/b

Poznámky: Dělení bylo vynikající.
Supernatant byl velmi čirý a pelety velmi pevné.
Dekantace byla velmi snadná.

pokus

201a/b

Dělení bylo vynikající.
Pelety byly velmi pevné.
Dekantace byla velmi snadná.

Tabulka III

Teplo + anorganická sůl + enzymy

č.	tepl. láz.	doba zahř. + enzym (h)	doba (sůl) (h)	sůl (typ) (g)	enzym (typ)	enzym (g)	dělení
300a	40°	05 ^{bb}	05 ^c	CaCl ₂ (0,4)	proteasa	(0,004)	4
300b	40°	05 ^{bb}	05 ^c	CaCl ₂ (0,4)	proteasa	(0,004)	4
310a	30°	18 ^b	01 ^{cc}	CaCl ₂ (0,147)	pektinasa	(1 ml)	4
310b	30°	18 ^b	01 ^{cc}	CaCl ₂ (0,147)	pektinasa	(1 ml)	4

Zjištění:

Zpracování 40ml vzorku celé mrkvové šťávy s 0,01 % hmotn. proteasy (inkubace při 40 °C po 5 hodin) neposkytuje viditelné dělení. Následující přídavek 0,0027 mol Ca⁺⁺ ve formě CaCl₂.H₂O poskytuje rychlé dělení vedoucí k čistšímu supernatantu a nižší viskozitě karotenoidového podílu než je obvyklé. Toto znamená, že degradace proteinu přítomného v mrkvové šťávě neovlivňuje dělení karotenoidů je-li použita samotná, ale může napomáhat při dosažení, použije-li se ve spojení se zpracováním s vápníkem.

Zpracování 40ml vzorku celé mrkvové šťávy s 0,01 % hmotn. pektinasy (inkubace při 30 °C po 18 h) neposkytuje viditelné dělení. Následným přídavkem 0,001 mol Ca⁺⁺ ve formě CaCl₂.H₂O iniciuje dělení během tří minut, které vede k čirému supernatantu a dobře definovanému karotenoidovému podílu během jedné hodiny. Toto znamená, že degradace pektinu přítomného v celé mrkvové šťávě neposkytuje dělení karotenoidů, jestliže se použije samotná, ale může napomáhat při urychlení separace, použije-li se ve spojení se zpracováním s vápníkem.

Tabulka IV

Teplo + anorganická sůl hm./úprava pH

č.	pH odečet	tepl. láz. (°C)	kontakt. doba (min)	sůl (typ)	sůl (g)	dělení
kontr.	-	-	-	-	-	0
kontr.	-	-	-	-	-	0
400a	6,50	60	10	CaCl ₂	(0,294)	4
400b	6,50	60	10	CaCl ₂	(0,294)	4
401a	7,00	60	10	CaCl ₂	(0,294)	4
401b	7,00	60	10	CaCl ₂	(0,294)	4
402a	8,00	60	10	CaCl ₂	(0,294)	4
402b	8,00	60	10	CaCl ₂	(0,294)	4
403a	9,00	60	10	CaCl ₂	(0,294)	4
403b	9,00	60	10	CaCl ₂	(0,294)	4
404a	10,00	60	10	CaCl ₂	(0,294)	4
404b	10,00	60	10	CaCl ₂	(0,294)	4
405a	11,00	60	10	CaCl ₂	(0,294)	4
405b	11,00	60	10	CaCl ₂	(0,294)	4

b = vzorek za konstantního míchání při 87 ot/min během ponoření do vodní lázně

bb = vzorek za konstantního míchání při 85 ot/min během ponoření do vodní lázně

c = sled: enzym a sůl se přidají ke vzorku s následujícím zpracováním teplem

cc = sled: enzym a sůl se přidají se zahříváním mezi přidáváním.

Pokusy se stejnými desítkovými číslicemi označují pokusy, které byly provedeny za použití stejného zdroje mrkvové šťávy. Pokusy lišící se pouze označením (a) (b) znamenají pár identicky zpracovaných vzorků.

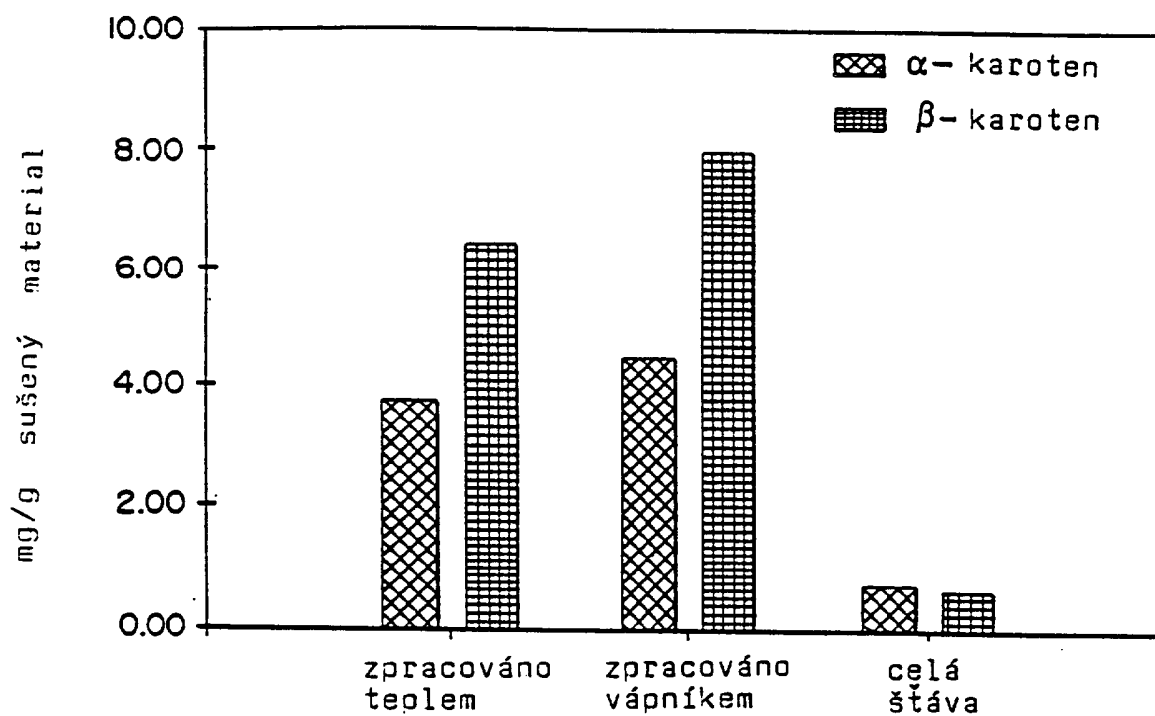
Popis včetně příkladů je zaměřen na pochopení vynálezu a v žádném případě není míněn jako omezující. Je možno provést různé modifikace a variace, aniž by byla narušena myšlenka vynálezu a jeho rozsah, daný připojenými nároky.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

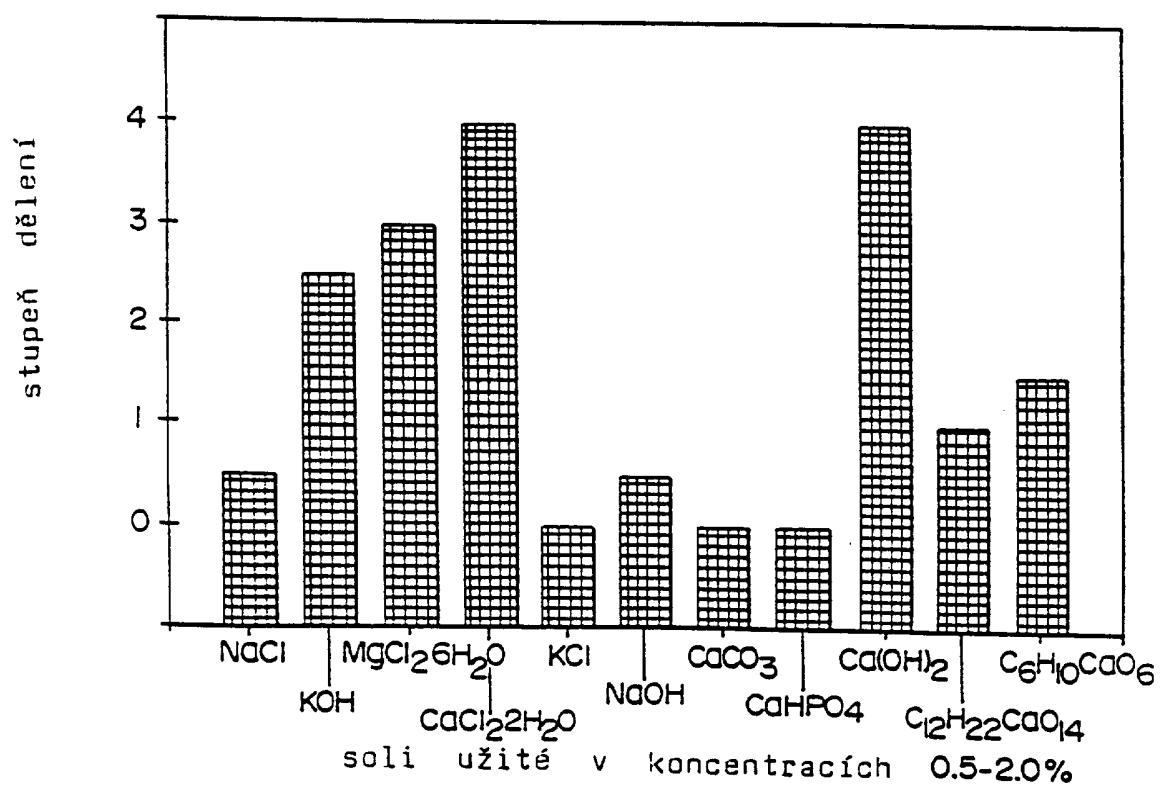
1. Způsob extrakce karotenoidů z přírodního zdroje bez použití uhlovodíkového rozpouštědla, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje stupně
 - a) rozdělení přírodního zdroje karotenoidů na kapalnou frakci, obsahující karotenoidy, a kašovitou frakci, I
 - b) kontakt kapalné frakce se srážecím činidlem, prostým uhlovodíkového rozpouštědla, vybraným ze skupiny, zahrnující 0,5 až 3 % hmotn. chloridu vápenatého, 0,05 až 2 % hmotn. hydroxidu vápenatého, 2 až 4 % hmotn. laktátu vápenatého a 4 až 6 % hmotn. glukonátu vápenatého, vztaženo na kapalnou frakci, tak, že se kapalná frakce rozdělí na pevnou vysráženou část, obohacenou o karotenoidy, a kapalnou část, ochuzenou o karotenoidy, přičemž jak pevná, tak kapalná část jsou prosty uhlovodíkového rozpouštědla, a
 - c) oddělení pevné části obohacené karotenoidy od kapalné části ochuzené o karotenoidy bez použití uhlovodíkového rozpouštědla tak, že se vytvoří karotenoidy obohacený pevný extrakt, který nebyl uveden do styku s uhlovodíkovým rozpouštědlem během extrakce.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kapalná frakce se uvede do kontaktu se srážecím činidlem při teplotě 40 až 60 °C.
3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kapalná frakce se uvede do kontaktu se srážecím činidlem na dobu alespoň 10 až 30 min.
4. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kapalná frakce se uvede do kontaktu se srážecím činidlem při teplotě 80 až 120 °C.
5. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se srážecí činidlo uvede do kontaktu s kapalnou frakcí na dobu menší než 20 min.
6. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kapalná frakce se uvede do kontaktu se srážecím činidlem na dobu menší než 2 min.
7. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že pH kapalné frakce je mezi 6 až 8.

2 výkresy

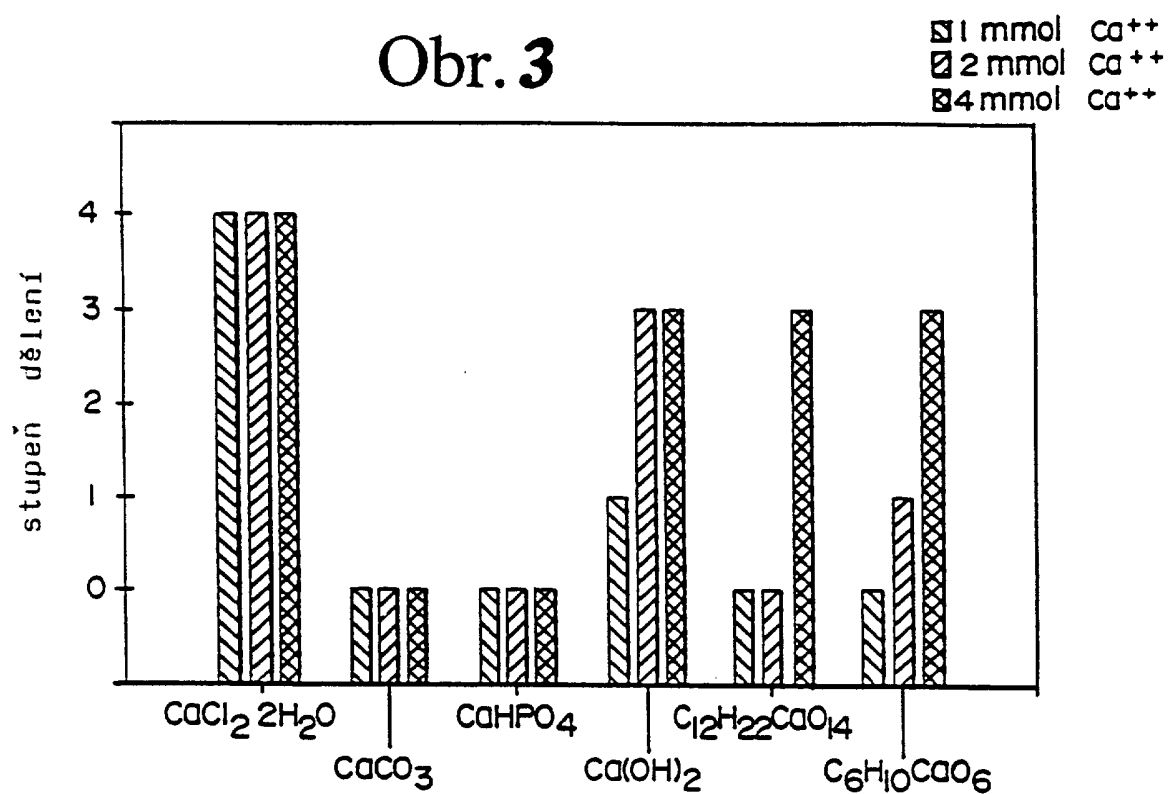
Obr. 1



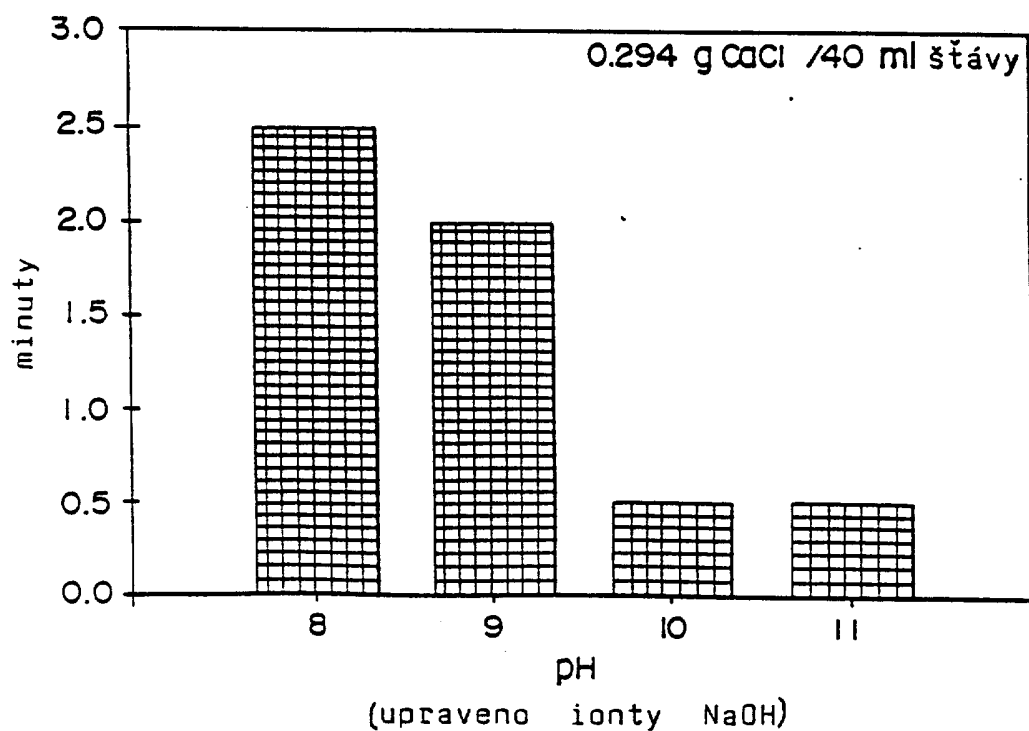
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Konec dokumentu