

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

306 700

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 36/15 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-870**

(22) Přihlášeno: **05.12.2014**

(40) Zveřejněno: **15.06.2016**

(Věstník č. 24/2016)

(47) Uděleno: **05.04.2017**

(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **17.05.2017**

(Věstník č. 20/2017)

(56) Relevantní dokumenty:
Bjame Holmbom et al: Knots in trees – A new rich source of lignans 2003 Phytochemistry Reviews 2, 331-340.
EP 2 143 435; US 2004199032; US 2008124414.

(73) Majitel patentu:
Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i., Praha
10 - Hostivař, CZ
Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta,
Lednice, CZ
Centrum výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i.,
Brno, CZ

(72) Původce:
Ing. Pavel Híc, Ph.D., Devičany, SK
doc. Ing. Josef Balík, Ph.D., Lednice, CZ
Ing. Jana Kulichová, Třebíč, CZ
prof. Ing. Jan Tríska, CSc., České Budějovice, CZ
Jan Strohalm, Praha 3, CZ
RNDr. Naděžda Vrchotová, CSc., České
Budějovice, CZ
Ing. Milan Houška, CSc., Praha 3, CZ

(74) Zástupce:
Patentová a známková kancelář Novotný, Ing.
Jaroslav Novotný, Římská 45/2135, 120 00 Praha 2

(54) Název vynálezu:
**Způsob výroby lignanů pro potravinářské
účely extrakcí ze suků jehličnanů**

(57) Anotace:
Způsob výroby lignanů pro potravinářské účely extrakcí
ze suků jehličnanů, spočívá v tom, že extrakce se provede
bez použití hexanu tak, že se suky jehličnanů nadrtí na
jemnou štěpku a tato štěpka se umístí do vody, která se
přivede do varu na určitou dobu. Na koncentrovaný
extrakt je poté aplikována lyofilizace, vedoucí k jeho
vysušení, nebo se využije vakuové rozprašovací sušárny.
Vysušený extrakt lignanů obsahující vedle HMR
oligosacharidy, převážně galaktoglukomannany, se
podrobí purifikaci a zakonzentrování rozpouštěním
přítomných lignanů v 96% obj. potravinářském lihu, ve
kterém se galaktoglukomannany nerozpouští.

CZ 306700 B6

Způsob výroby lignanů pro potravinářské účely extrakcí ze suků jehličnanů

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu výroby lignanů pro potravinářské účely extrakcí ze suků jehličnanů, zejména hydroxymatairesinolu (dále HMR) a alfa-conidendrinu (dále Coni), ze štěpky smrkových nebo borovicových suků.

10

Dosavadní stav techniky

Lignany patří do široké skupiny rostlinných fenolů, které na sebe v posledních dvou dekáдах upozorňují nejen pro své četné biologické účinky, ale také svou strukturní bohatostí a druhovou rozmanitostí. Z hlediska struktury jsou lignany tvořeny dvěma fenyl-propanovými jednotkami, které jsou spojeny přes centrální beta uhlíky obou postranních řetězců. Tvoří tak nejčastěji dimery, ale v posledních letech byly v různých druzích měkkých dřevin popsány i vyšší lignany - oligolignany, konkrétně se jedná o seskvi-, di-, a sesterolignany. Jako sekundární metabolity cévnatých rostlin vynikají účinky antioxidačními, protinádorovými, antivirovými, antibakteriálními, insekticidními, fungicidními, estrogenními, antiestrogenními a v neposlední řadě i ochrannými účinky proti srdečním chorobám. Zvýšený zájem o lignany vychází především z možnosti jejich využití ve farmacii a výživě.

Nejčastěji se nacházejí ve dřevě a kůře stromů, ale i v kořenech, listech, květech, plodech a semenech rostlin. Lignany se vyskytují jednak ve volné formě v podobě aglykonů zejména v dřevinách a dále pak vázané na širokou skupinu sacharidů v případě zemědělských produktů. Lignany a další rostlinné polyfenoly se běžně vyskytují v jádrovém dřevu stromů, přičemž lignany jsou obsaženy převážně v měkkých dřevinách (jehličnany), zatímco flavonoidy v dřevinách s tvrdým jádrem. Stilbeny jsou dále typické pro borovice a jsou obsaženy také v kůře stromů. V nedávné době byl skupinou finských vědců publikován objev pravděpodobně nejbohatšího přírodního zdroje lignanů. Holmbom et al objevili v sucích stromů v průměru 5 až 10 hmotn. % lignanů, přičemž suky smrku ztepilého (*Picea abies*) dosahovaly hodnoty až 6 až 29 hmotn. % s nejvíce zastoupeným lignanem – hydroxymatairesinolem (HMR), který tvořil 70 až 85 % z celkového obsahu lignanů. [Holmbom B., Eckerman Ch., Eklund P., Hemming J., Nisula L., Reunanen M., Sjöholm R., Sundberg A., Sundberg K., Willför S.: Knots in trees – A new rich source of lignans. *Phytochemistry Reviews* 2, 331–340 (2003)]

Vedle HMR suky některých měkkých dřevin obsahují další zástupce lignanů jako je matairesinol (MR), secoisolariciresinol (Seco), lariciresinol (Lari), cyclolariciresinol (cLari), alfa-conidendrin (Coni), nortrachelogenin (NTG), lignan A (LigA), isoliovil (Ilio) a další.

Lignany obsažené v sucích (v dřevní hmotě) smrku ztepilého jsou málo rozpustné ve vodě a jednoduchá macerace dřevní hmoty vodou nebo moštěm je nedostatečná pro zvýšení jejich obsahu. Suky bohaté na lignany obsahují značné množství pryskyřice, která by částečně přešla do nápoje při maceraci suků nápojem s obsahem alkoholu. Proto je tedy nutno pryskyřici před vlastní extrakcí lignanů odstranit, nejlépe hexanem. Toto rozpouštědlo však není povoleno k použití pro látky později přidávané do potravin, z důvodu výskytu jeho možných zbytků v následně připravovaných zejména lihových extraktech lignanů.

Existující vynálezy extrakce lignanů se většinou týkají jiných surovin než jehličnanů, viz například Čínský patent CN 102633847 A se zabývá extrakcí lignanů z lněných semínek za použití ultrazvuku a separací a čištěním získaných lignanů na makroporézní pryskyřici. Čínský patent CN 102532211 B se zabývá extrakcí glykosidického derivátu (sloučeniny C38 H56 O22) z kaštanovníku (*Castanea henryi*) extrakcí organickými rozpouštědly a čištěním získaného extraktu pomocí chromatografických metod. Další čínský patent CN 102093749 A se týká přípravy

přírodního pigmentu z rostliny *Schizandrachinensis* vyznačující se tím, že k extrakci se používá methanol nebo etanol s přidavkem povrchově aktivní látky. Rovněž další čínský patent CN 101973856 A se zabývá extrakcí rostliny *Schizandrachinensis* pomocí petroléru a ultrazvuku s cílem získání čistého schizandrinu A.

Existují však dva patenty, které obsahují, mimo jiné, již výše zmíněnou extrakci hexanem. Tato metoda není povolena pro následné využití v potravinářství. Jde o patent US 2004/199032 [Extrakce flavonoidů, lignanů a/nebo taninů z dřevní hmoty rozpouštědly] chrání extrakci lignanů ze dřeva a ze suků jehličnanů. Jako extrakční činidla jsou uvedena polární rozpouštědla s dipól momentem vyšším než 3 při 25 °C. Mezi polární rozpouštědla je zde zmíněna i čistá voda ale i kombinace aceton/voda a alkohol/voda. Další patent US 2008/124414 rozšiřuje předchozí patent a má název [Extrakce suků polárními rozpouštědly a využití extraktu jako antioxidačního přídatku v elastomerech, plastech, benzínu, bio-olejích, pro stabilizaci mazadel, lepidel, v potravinách, v kosmetice, obalech, nátěrech a disperzích jako biocidy, speciálně fungicidy, baktericidy nebo insekticidy]. Příprava je opsána z minulého patentu, ale podstatně rozšířena o antioxidační vlastnosti. Podstatné je, že extrakce je nejprve provedena hexanem s cílem odstranění pryskyřic a teprve poté je provedena extrakce směsí aceton/voda nebo alkohol/voda, ale za přesně definované teploty 25 °C.

20 Podstata vynálezu

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob výroby lignanů pro potravinářské účely extrakcí ze suků jehličnanů podle tohoto vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že extrakce se provede bez použití hexanu tak, že suky z jehličnanů se nadrtí na jemnou štěpku, která se vloží do vody a tato směs se přivede k varu po dobu 1 až 60 minut, přičemž směs se opakovaně, po slití prvního extraktu, doplní vodou a znovu uvede do varu po dobu 1 až 60 minut, kdy po spojení obou extraktů se provede odpar vody za sníženého tlaku o hodnotě 5 až 80 kPa a směs zbavená odpařené vody se lyofilizuje, nebo suší na vakuové rozprašovací sušárně při teplotě 60 až 80 °C. Vysušený extrakt lignanů obsahující vedle HMR oligosacharidy, převážně galaktoglukomannany, se dále podrobí purifikaci a zakoncentrování rozpuštěním přítomných lignanů v 96% obj. potravinářském lihu, ve kterém se galaktoglukomannany nerozpouští, lihový extrakt se filtruje a vakuově zahustí pro přímou aplikaci do potravin, anebo se dále čistí krystalizací, chromatografií na sloupci sorbentu, anebo srážením komplexu lignanů (zejména HMR), přidáním nasyceného roztoku octanu draselného.

Vytvořený komplex extraktu lignanů podle tohoto vynálezu má největší přednost v tom, že je možno extrakt přidávat přímo do potravin a nápojů, neboť neobsahuje zbytky hexanu.

40 Příklad uskutečnění vynálezu

Byla zvolena čtyřnásobná postupná extrakce štěpky smrkových suků bez předcházející extrakce hexanem. Suky smrku ztepilého (*Picea abies*) byly podrobeny senzorické kontrole a následně namlety pomocí střížného mlýna (například Cutting Mill SM 100, Retsch, Haan, Německo). Navázilo se 200 g štěpky a tato navážka se zalila 800 g deionizované vody. Směs se vařila v 2000 ml baňce pod zpětným chladičem 30 minut. Následně byl ještě za horka slit tekutý vodní extrakt ze zbytků štěpky. Zbytek v baňce se zalil další deionizovanou vodou na celkovou hmotnost 1000 g (hmotnost štěpky + vody). Znovu proběhl var pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Opět se slil tekutý podíl a přidal se k prvnímu slitému extraktu. Zbytek se v baňce potřetí zalil deionizovanou vodou na celkovou hmotnost 1000 g. Znovu proběhl var pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Potřetí se slil vodní extrakt k předešlým dvěma slitým objemům. To znamená, že trojnásobnou extrakcí 200 g štěpky bylo získáno 1798 g vodného extraktu.

Dále bylo provedeno zahušťování surového extraktu a jeho sušení. Získaný surový vodný extrakt obsahuje velkou část prachových zbytků dřeva a extrahovaných oligosacharidů. Celá hmotnost získaného surového extraktu (1798 g) se zahušťovala vakuovým varem při absolutním tlaku 20 000 Pa na vakuové odparce na objem přibližně 150 ml. Tento objem byl kvantitativně převeden (+ oplachová deionizovaná voda) na celkový objem 200 ml. Tak bylo získáno 200 ml koncentrovaného nepurifikovaného extraktu z 200 g štěpky. Zahuštěný nepurifikovaný extrakt byl zcela vysušen lyofilizací.

Dále byla provedena purifikace produktu a zakoncentrování lignanů tak, že k vysušenému produktu byl přidán 96% obj. potravinářský líh v množství 100 ml pro oddělení lignanů. Dokonalá homogenizace byla provedena pomocí ultrazvuku. Homogenát byl extrahován s přidavkem dalších 100 ml 96% obj. potravinářského lihu v Soxhletově přístroji, po dobu 60 minut v papírové patroně, pro oddělení nerozpustného zbytku například zbytků pilin a v alkoholu nerozpustných oligosacharidů. Získaných 200 ml extraktu bylo zahuštěno pomocí vakuové odparky na objem 50 ml etanolového roztoku s celkovým obsahem 8,1 g HMR, tj. 162 mg HMR/ml. Konečné výsledky obsahu lignanu HMR v etanolovém extraktu jsou uvedeny v tabulce. Je patrné, že opakování postupu přináší téměř stejné koncentrace tohoto lignanu a průměrnou výtěžnost kolem 4 % (vztaženo na původní hmotnost štěpky suků).

20

Výsledky z čtyřikrát opakované přípravy extraktů lignanů z štěpky smrkových suků

Opakování	Hmotnost štěpky (g)	Objem finálního etanolového extraktu (ml)	HMR (g/50 ml)	HMR (mg/ml)
1.	200	50	7,7	154
2.	200	50	7,0	140
3.	200	50	9,0	180
4.	200	50	8,5	170
průměr +/- SD	200	50	8,1 +/- 0,9	162 +/- 18

25 Průmyslová využitelnost

Extrakce lignanů popsaným způsobem eliminuje nutnost použití organických rozpouštědel k odstranění nežádoucích pryskyřic. Získané koncentráty lignanů jsou využitelné při obohacování nealkoholických nápojů, nápojů na bázi vína nebo v jiném výrobku nápojového průmyslu. Takto získané koncentráty lignanů je možno využít i při přípravě obohacených džemů, ovocných pomazánek, sirupů, ale i doplňků stravy a výrobků pro zvláštní lékařské účely.

30

PATENTOVÉ NÁROKY

5 **1.** Způsob výroby lignanů pro potravinářské účely extrakcí ze suků jehličnanů, **v y z n a ě u -**
 j í c í s e t í m, že extrakce se provede bez použití hexanu tak, že suky z jehličnanů se nadrtí
 na jemnou štěpku, která se vloží do vody a tato směs se přivede k varu po dobu 1 až 60 minut,
 přičemž směs se opakovaně, po slítí prvního extraktu, doplní vodou a znovu uvede do varu po
10 dobu 1 až 60 minut, kdy po spojení obou extraktů se provede odpar vody za sníženého tlaku
 o hodnotě 5 až 80 kPa a směs zbavená odpařené vody se lyofilizuje, nebo suší na vakuové rozpra-
 šovací sušárně při teplotě 60 až 80 °C.

2. Způsob výroby lignanů pro potravinářské účely extrakcí ze suků jehličnanů podle nároku 1,
 v y z n a ě u j í c í s e t í m, že vysušený extrakt lignanů obsahující vedle hydroxymatairesino-
15 lu oligosacharidy, převážně galaktoglukomannany, se dále podrobí purifikaci a zakoncentrování
 rozpuštěním přítomných lignanů v 96% obj. potravinářském lihu, ve kterém se galaktoglukoman-
 nany nerozpouští, lihový extrakt se filtruje a vakuově zahustí pro přímou aplikaci do potravin,
 a/nebo se dále čistí krystalizací, chromatografií na sloupci sorbentu, a/nebo srážením komplexu
 lignanů, zejména hydroxymatairesinolu, přidáním nasyceného roztoku octanu draselného.

20

25

Konec dokumentu
